

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Dynamische, kontrastverstärkte Computertomographie und  
Dual-Energy-Computertomographie zum Monitoring der  
Therapieeffekte von Regorafenib auf experimentelle  
Kolonkarzinom-Xenografts in der Ratte**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Alexandra Lialias, geb. Michels  
aus Rheda-Wiedenbrück

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens C. Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Kolligs  
PD Dr. Wolfgang Fendler  
PD Dr. Clemens Gießen-Jung

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ralf Eschbach

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Versuchsaufbau .....	7
2.1.1	Tumormodell .....	9
2.1.2	Tumorzellinokulation .....	10
2.1.3	Regorafenib-Therapie.....	11
2.2	CT-Untersuchungen.....	14
2.2.1	Kontrastmittel .....	16
2.2.2	DCE-Computertomographie.....	17
2.2.3	DE-Computertomographie.....	22
2.2.4	Tumordurchmesser .....	29
2.3	Immunhistochemie .....	29
2.3.1	HE-Färbung.....	30
2.3.2	Anti-CD31- und Ki-67-Färbung .....	31
2.3.3	TUNEL-Färbung.....	32
2.4	Statistik.....	33
3	Ergebnisse .....	35
3.1	CT-Perfusionsparameter .....	35

3.1.1	Plasmafluss .....	36
3.1.2	Plasmavolumen .....	37
3.1.3	Permeability-Surface Area Product.....	39
3.2	Dual-Energy-Computertomographie.....	42
3.3	Tumordurchmesser .....	43
3.4	Immunhistochemie .....	46
3.4.1	HE .....	49
3.4.2	CD31 .....	50
3.4.3	Ki-67.....	51
3.4.4	TUNEL .....	52
3.5	Korrelationen.....	53
3.5.1	Korrelation zwischen CT und Immunhistochemie .....	53
3.5.2	DCE-CT/Immunhistochemie .....	53
3.5.3	DE-CT/Immunhistochemie .....	56
3.5.4	Korrelation zwischen DCE-CT und DE-CT .....	56
3.5.5	Korrelationen zwischen Tumordurchmesser und DCE-CT sowie Immunhistochemie .....	57
4	Diskussion .....	58
4.1	DCE-CT als Biomarker für ein Therapieansprechen .....	59
4.2	DE-CT als Biomarker für ein Therapieansprechen .....	62

4.3	Tumordurchmesser .....	66
4.4	Immunhistochemische Validierung der CT-Biomarker .....	66
4.5	Limitationen .....	68
5	Zusammenfassung .....	70
6	Literaturverzeichnis .....	72
7	Abkürzungsverzeichnis.....	77
8	Tabellenverzeichnis.....	80
9	Abbildungsverzeichnis .....	81
10	Danksagung.....	86
11	Eidesstattliche Versicherung.....	87

## 1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden viele neue molekulare Medikamente in die klinische Routine eingeführt, die gezielt auf bestimmte Stoffwechselschritte von Tumorzellen wirken. Zu diesen Medikamenten gehören die Tyrosinkinase-Inhibitoren, die unter anderem eine Inhibition der Angiogenese bewirken. Sie sind heute für die Behandlung zahlreicher Tumorentitäten, wie z.B. Nierenzellkarzinome, Schilddrüsenkarzinome und das hepatozelluläre Karzinom zugelassen [1-3].

Die Angiogenese stellt eine essentielle Grundlage für das Tumorwachstum dar, da sich Zellen maximal über eine Strecke von ca. 2 mm über Diffusion ernähren können [4]. Sobald diese Grenze erreicht wird, kommt es zur Hypoxie im Gewebe und dadurch zur Ausschüttung von intrazellulären Transmittern, wie dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), einem Transkriptionsfaktor, der über die Aktivierung verschiedener Gene und die Expression von Wachstumsfaktoren zur Gefäßneubildung führt [5]. Ein wesentlicher Wachstumsfaktor in diesem Zusammenhang stellt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dar, der bereits 1971 von Folkman als mögliches Ziel einer Krebstherapie identifiziert wurde [6].

Regorafenib ist ein Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor, der über die Hemmung verschiedener Proteinkinasen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, die VEGF-Rezeptoren 1-3 oder die Onkogene KIT, RET (Rearranged during Transfection) und RAF1 (rapidly growing fibrosarcoma-1) wirkt, wodurch die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum reduziert

werden [7]. Für Regorafenib konnten in *in-vivo* Studien antiangiogenetische und antiproliferative Effekte für verschiedene Tumorentitäten, wie Kolon-, Mamma- und Nierenzellkarzinome nachgewiesen werden [8]. 2012 wurde Regorafenib in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) für die Therapie von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom zugelassen, bei denen es unter der Erstlinien-Chemotherapie zu einem Progress gekommen ist [9]. 2013 wurde Regorafenib in den USA auch für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zugelassen [10]. Da molekulare Medikamente, wie Regorafenib, hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursachen, nicht unerhebliche unerwünschte Nebenwirkungen besitzen und nicht bei jedem Patienten suffizient wirken [11, 12], ist die frühe Beurteilung eines Therapieansprechens und die Differenzierung zwischen Respondern und Non-Respondern von großer Bedeutung. Das Ziel ist eine personalisierte Medizin, welche die bestmögliche Behandlung für jeden Patienten ermöglicht.

Eine etablierte Methode zur Beurteilung eines Therapieansprechens bei soliden Tumoren stellt die Messung der Größenveränderung des Tumors unter Therapie dar. 1979 wurden die ersten standardisierten Kriterien zur Beurteilung eines Therapieansprechens von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlicht. Nach diesen Kriterien wird der maximale Längsdurchmesser im axialen Schnittbild mit dem orthogonal dazu gemessenen Querdurchmesser multipliziert [13]. Im Jahr 2001 wurden neue Kriterien entwickelt, die sogenannten RECIST-Kriterien (response evaluation criteria in solid tumors), nach denen die Summe der maximalen Längsdurchmesser der Läsionen im axialen Schnittbild bestimmt

werden [14]. Entsprechend der gemessenen Veränderungen erfolgt eine Einteilung in complete response, partial response, stable disease oder progressive disease. Im Jahr 2009 wurden diese Kriterien erneut überarbeitet und als RECIST-1.1 veröffentlicht [15]. Die wesentlichen Änderungen gegenüber der ersten Version bestehen zum einen in der Reduktion der maximalen Anzahl gemessener Ziel-Läsionen zum anderen in der Berücksichtigung von Lymphknoten. Die WHO- und RECIST-Kriterien beurteilen ausschließlich morphologische Veränderungen der Tumore. Molekulare Medikamente wie Regorafenib wirken jedoch in erster Linie nicht, wie klassische Chemotherapeutika, primär zytotoxisch, sondern antiangiogenetisch und zytostatisch. Weil dadurch häufig nur diskrete Effekte auf die Tumormorphologie zu verzeichnen sind, sind diese Kriterien allein hier oft nicht ausreichend zur Beurteilung eines frühen Therapieansprechens [16]. Studien haben gezeigt, dass sich durch die Behandlung mit Multikinase-Inhibitoren, zwar die Struktur und die Durchblutung eines Tumors verändern, diese Veränderungen jedoch nicht zwingend mit einer Größenänderung einhergehen [4]. Es besteht daher ein Bedarf an anderen, möglichst nichtinvasiven Verfahren, um die Vaskularisation und Vitalität von Tumoren suffizient zu beurteilen [17]. Studien haben gezeigt, dass verschiedene nicht invasive, funktionelle und molekulare bildgebende Verfahren das Potential zur *in vivo* Beurteilung eines Therapieansprechens molekularer Therapeutika haben und entsprechende Biomarker für ein Therapiemonitoring darstellen können [4].

Ein mögliches molekulares bildgebendes Verfahren stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar, welche unter Verwendung spezifischer Tracer, wie zum Beispiel der



radioaktiv markierten  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxy-Glukose ( $^{18}\text{F}$ -FDG), den Tumormetabolismus darstellen kann [18]. Es konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass die PET eine Evaluation der Therapieeffekte von Tyrosinkinase-Inhibitoren ermöglicht. Choi et al konnten zum Beispiel 2004 nachweisen, dass die PET-CT als spezifische und sensitive Methode des Therapiemonitorings für frühe Effekte des Proteinkinaseinhibitors Imatinib bei GIST geeignet ist [19, 20]. Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung eines Therapieansprechens besteht in der Bestimmung funktioneller Parameter, wie der Perfusion des Tumors. Diese kann sowohl mit der dynamischen, kontrastverstärkten Computertomographie (DCE-CT), als auch mit der dynamischen, kontrastverstärkten Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) gemessen werden. Sterzik et al. zeigten 2015 *in vivo* in einem Tiermodell an Hypopharynx-Karzinomen unter einer Kombinationstherapie mit Celecoxib, Ilomastat und dem uPA-Hemmer (urokinase-type plasminogen activator) Upomostat, dass der Therapieeffekt antiangiogenetischer Medikamente mit DCE-MRT nachweisbar ist [21]. Bei der DCE-CT und DCE-MRT werden anhand der Kontrastmitteldynamik hämodynamische Parameter wie der Blutfluss, das Blutvolumen und die Gefäßpermeabilität im Tumor mit Hilfe dedizierter kinetischer Modelle berechnet, welche bereits in früheren Studien signifikante Korrelationen zu repräsentativen immunhistochemischen Parametern der Tumorpathophysiologie zeigten [22-25].

Eine weitere Methode zur Beurteilung des Therapieansprechens einer antiangiogenetischen Therapie stellt die Dual-Energy-Computertomographie (DE-CT) dar, welche durch zeitgleiche Akquisition zweier Bilddatensätze bei unterschiedlicher Röhrenspannung die Differenzierung

und Quantifizierung von Materialien anhand ihres Schwächungsverhaltens ermöglicht [26]. Dies gelingt vor allem bei Elementen mit einer hohen Ordnungszahl wie zum Beispiel Jod. So ist man in der Lage nach Applikation eines jodhaltigen Kontrastmittels die Jodmenge im Gewebe direkt zu quantifizieren, um so auf die Perfusion zurück zu schließen. Die Dual-Energy-Technologie hat sich in den letzten Jahren immer mehr verbreitet, seitdem sie 2009 vor allem zur Verbesserung der kardialen Bildgebung in der klinischen Anwendung etabliert wurde. Heute wird sie in der klinischen Routine für viele verschiedene Anwendungen genutzt, zum Beispiel für die Charakterisierung von Nieren- und Harnleitersteinen [27], für die Differenzierung von Nierenraumforderungen [28] oder für die Quantifizierung des Kalziumgehalts in den Koronararterien [29]. Mögliche Einsätze der DE-CT in der onkologischen Bildgebung stellen Diagnosestellung, Staging, Therapieplanung, Tumorcharakterisierung und Therapiemonitoring dar [30]. Im Bereich des Therapiemonitorings bei antiangiogenetischen Therapien gibt es bislang wenige, aber vielversprechende Studien, die das Potenzial der Dual-Energy-Technologie zeigten [31, 32]. Apfaltrer et al. zeigten zum Beispiel, dass die DE-CT das Potential zum Therapie-Monitoring metastasierter GIST hat [31].

### **Zielsetzung und Fragestellung der Studie**

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine randomisierte, tierexperimentelle Studie mit einem heterotopen Tumormodell in der Ratte. Die Hypothese der Studie war, dass DCE-CT und DE-CT ein *in vivo* Monitoring der antiproliferativen und antiangiogenetischen Effekte von Regorafenib auf Kolonkarzinom-Xenografts ermöglichen.

Ziel der Studie war die Entwicklung bildgebender, funktioneller Parameter als nicht-invasive Biomarker für das Therapiemonitoring einer Regorafenib-Therapie bei Kolonkarzinomen mit immunhistochemischer Validierung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

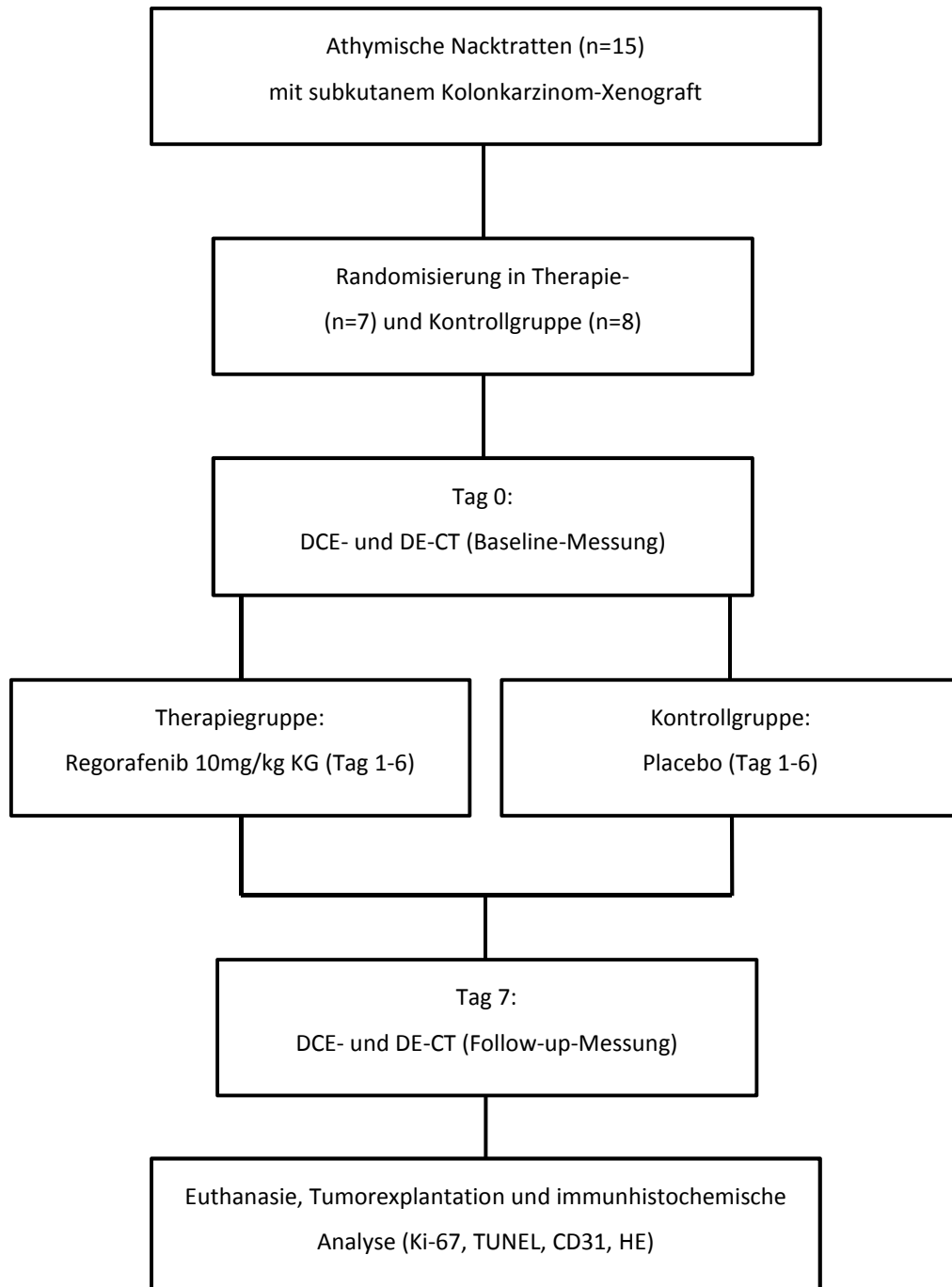
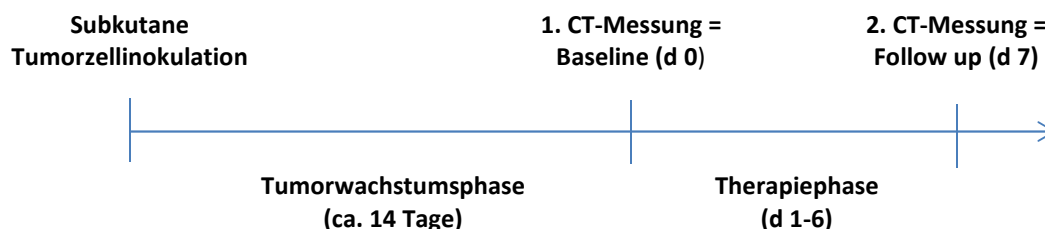


Abbildung 1: Versuchsaufbau mit Einteilung in Therapie- und Kontrollgruppe

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine tierexperimentelle Studie an Ratten mit einem Kolonkarzinom-Xenograft in der linken Flanke. Für die Studie wurden 15 athymische Nacktratten verwendet, welche randomisiert in eine Therapie- und eine Kontrollgruppe eingeteilt wurden (s. Abbildung 1). Nach Tumorzellinokulation ( $6 \times 10^6$  Zellen pro Tier) und einer etwa zweiwöchigen Tumorstadiumsphase wurde eine Baseline DCE- und DE-CT-Messung durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere 6 Tage mit einer gewichtsadaptierten Menge Regorafenib- oder einer volumenäquivalenten Menge an Placebo-Lösung behandelt. Am Tag 7 erfolgte eine zweite DCE- und DE-CT-Messung aller Tiere zum Follow-up. Im Anschluss an die Follow-up-Messung wurden die Ratten durch eine intrakardiale Injektion von 5 ml Kaliumchlorid euthanasiert und die Tumore wurden anschließend chirurgisch explantiert. Die explantierten Tumore wurden in Formalin fixiert und schließlich immunhistochemisch aufgearbeitet. Der chronologische Versuchsablauf kann der nachfolgenden Graphik entnommen werden (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Zeitachse des chronologischen Versuchsablaufs**

### 2.1.1 Tumormodell

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: GZ 55.2-1-54-2532-33.10). Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß den Anforderungen nach § 2 Tierschutzgesetz (TierSchG) und der Tierschutz-Versuchstierverordnung unter spezifisch pathogen-freien (SPF-) Bedingungen. Die Durchführung der Versuche erfolgte in Einklang mit den Leitlinien für die Pflege und Nutzung von Labortieren der US-amerikanischen National Institutes of Health. Für die Versuche wurden n=15 athymische, weibliche Nacktratten im Alter von 7-8 Wochen verwendet (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Durch eine homozygote Mutation im FOXP1-Gen (forkhead box N1) auf Chromosom 10 besitzen diese Ratten kein Thymusgewebe mit konsekutiv stark eingeschränkter zellulärer Immunabwehr als Voraussetzung für das Wachstum humaner Tumorzellen als Xenograft. Die Tiere wurden einem 12 stündigen Licht-Dunkel-Zyklus exponiert. Futter und Wasser wurden ad libitum gereicht.

Für das Tumormodell wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (ATCC HTB-38<sup>TM</sup>, Wesel, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um Zellen eines gut differenzierten Adenokarzinoms, welche erstmals 1964 von Jorgen Fogh bei einem 44-jährigen Patienten aus einem primären Kolonkarzinom isoliert wurden [33]. Die Kultur der Zellen erfolgte unter einer Sterilbank in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen. Die HT-29-Zellen wurden in McCoy 5A Medium (Gibco Life Technologies, Eckstein, Deutschland) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratoriers, Paching, Österreich) bei 5% CO<sub>2</sub>, 85% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert. Sobald die Zellen eine Zelldichte von 90% erreicht hatten, wurden sie passagiert.

Hierfür wurden zunächst Reste des Serums mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (Gibco Life Technologies, Eckstein, Deutschland) abgespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-/Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Lösung (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) für ca. 2 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. EDTA als Calcium-Chelator löst die Zell-Zell-Verbindungen, Trypsin als Peptidase die Zell-Matrix-Verbindungen. Nachdem die Zellen sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben, wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Zur Aufbewahrung wurden die Zellen während ihrer exponentiellen Wachstumsphase in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Gefrierschutzmittel wurde 10%-iges Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit Trypsin gelöst und dann in 10 ml Kulturmedium zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 800 rpm, 2 min). Im Anschluss wurden die sedimentierten Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Danach wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

### **2.1.2 Tumorzellinokulation**

Zur Tumorzellimplantation wurden die Versuchstiere in einer speziellen Narkoseeinheit durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (5% Isofluran, O<sub>2</sub>-Flussrate 2 l/min) anästhesiert. Die Ratten wurden dann aus der Narkoseeinheit herausgenommen und die Narkose über eine Maskenbeatmung weiter aufrechterhalten (2,5 % Isofluran, O<sub>2</sub>-Flussrate 2 l/min). Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch eine fehlende Auslösbarkeit des

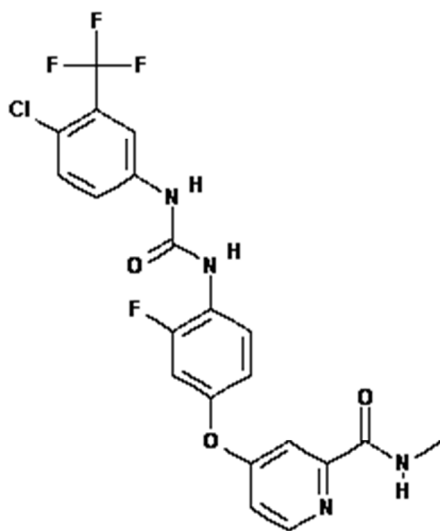
Zwischenzehenreflexes überprüft. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml gelöst, als eine 1:1-Mischung von Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit einem pH von 7,4 und Matrigel® (BD Biosciences, San Jose, CA). Nach Desinfektion erfolgte die subkutane Injektion von  $6 \times 10^6$  Tumorzellen heterotop über der linken Flanke mit einer 20 G-Kanüle (Sterican®, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) und die Tiere wurden randomisiert einer Therapie- und einer Kontrollgruppe zugeteilt. Nach ausreichendem Tumorwachstum wurde mit der Therapie begonnen. In der Therapiegruppe erhielten die Tiere 10 mg/kg Körpergewicht Regorafenib, welches in einem Gemisch aus 1,2 Propylenglykol, PEG 400 und Pluronic F68 (42.5/42.5/15 + 20% Aqua) gelöst war. In der Kontrollgruppe erhielten die Tiere die volumenäquivalente Menge des Lösungsmittels von Regorafenib. Die Applikation von Regorafenib beziehungsweise des Placebos erfolgte in einem Gesamtvolumen von 0,35 ml einmal täglich über einen Zeitraum von einer Woche (Tag 1-6) mit einer speziellen Knopfsonde via Gavage unter kurzer Isoflurananästhesie.

### 2.1.3 Regorafenib-Therapie

Regorafenib (BAY 73-4506, Stivarga®, Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland) ist ein Multityrosinkinase-Inhibitor mit der Summenformel  $C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$  (s. Abbildung 3). Von der Food and Drug Administration (FDA) wurde das Medikament 2012 in den USA für die Therapie von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom zugelassen. Die Zulassung erfolgte auf der Grundlage der randomisierten und placebokontrollierten, multizentrischen CORRECT-Studie [7], an der 760 Patienten aus 16 Ländern mit histologisch gesichertem Adenokarzinom des Kolons oder Rektums und Progress unter Erstlinien-Chemotherapie



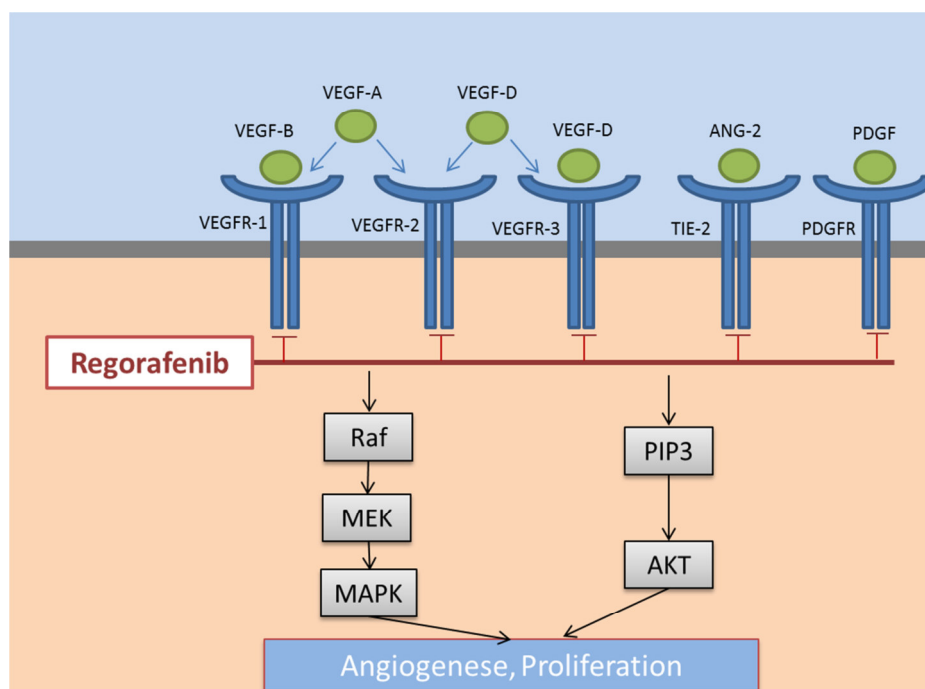
teilnahmen. Die Erstlinientherapie variiert von Land zu Land, häufig werden Kombinationen aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX) oder aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Irinotecan (FOLFIRI) verwendet. Die Ergebnisse der Studie zeigten eine signifikante Verbesserung der medianen Gesamtüberlebenszeit bei Patienten, die mit Regorafenib behandelt wurden, im Vergleich zu denen, die ein Placebo erhielten. 2013 wurde Regorafenib in den USA auch für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zugelassen [10].



**Abbildung 3: Strukturformel von Regorafenib ( $C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$ ),**  
Quelle: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Regorafenib wirkt über die Blockade von Tyrosinkinasen antiproliferativ und antiangiogenetisch [8]. Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung der Zelle. Es handelt sich um Proteinkinasen, die über die Phosphorylierung anderer Proteine über intrazelluläre Signalkaskaden die Aktivität von Zielproteinen beeinflussen. Durch

Mutationen sind diese Signalwege in Tumorzellen vermehrt aktiv, was zum Wachstum der Tumore führt. Durch Regorafenib werden Rezeptor-Tyrosinkinasen wie VEGFR 1 – 3, TIE2 und PDGFR blockiert. VEGFR und TIE spielen eine bedeutende Rolle bei der Gefäßneubildung und PDGFR für die Gefäßstabilisierung [8]. RET und KIT sind weitere Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche durch Regorafenib blockiert werden. Sie gehören zu den Protoonkogenen, welche durch Mutation zu Onkogenen werden und damit ein ungebremses Wachstum der Zelle ermöglichen. Ein weiterer Angriffspunkt von Regorafenib ist die intrazelluläre Kinase RAF, die ebenfalls zu den Protokonkogenen gehört (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Regorafenib blockiert zahlreiche membranständige Rezeptoren (u.a. VEGFR-1,2 und 3, TIE-2 und PDGFR) und intrazelluläre Kinasen (Raf). Hierdurch werden Signalwege der Angiogenese und Proliferation des Tumors gehemmt.**

Regorafenib wird oral eingenommen. Es wird in der Leber metabolisiert und sowohl über Faeces (71 %) also auch über die Nieren (19 %) ausgeschieden [34]. In der CORRECT-Studie traten bei 93 % der behandelten Patienten unerwünschte Nebenwirkungen auf, am häufigsten Hand-Fuß-Syndrom, Fatigue, Diarrhö, Hypertonie, Ausschlag und Hautschuppung [7].

### 2.2 CT-Untersuchungen

Die Ratten wurden für die CT-Messungen mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in einer luftdicht abgeschlossenen Narkoseeinheit aus Plexiglas narkotisiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5 % Isofluran ( $O_2$ -Fluss 2l/min), die Aufrechterhaltung der Narkose mit 2,5 % ( $O_2$ -Fluss 2 l/min). Für die Kontrastmittelapplikation wurde eine 25 Gauge Flügelkanüle (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) in die Schwanzvene gelegt. Zur Messung wurden die Ratten mit dem Kopf voraus in Bauchlage in den CT-Scanner hineingelegt.

Die Untersuchungen wurden an einem klinischen 128-Zeilen CT (Somatom Definition Flash®, Siemens Healthcare, Forchheim, Deutschland) durchgeführt. Bei dem Gerät handelt es sich um ein Dual-Source-CT mit zwei Röntgenröhren und zwei gegenüberliegende Detektoren. Da man die beiden Röntgenröhren gleichzeitig mit unterschiedlich hohem Energieniveau betreiben kann, spricht man von Dual-Energy-CT.

Zunächst wurden ein Topogramm sowie eine native Spiral-CT über Thorax und Abdomen gefahren, um den genauen Messbereich für die Perfusionsbildgebung auszuwählen. Die Messzeit der anschließenden DCE-CT betrug insgesamt 90 Sekunden, wobei der Scan 5 Sekunden vor der Kontrastmittelgabe begonnen wurde. Zur Untersuchung der Kontrastmitteldynamik im Tumor wurde den Ratten 2 mg/kg Körpergewicht des Kontrastmittels Iopromid (Ultravist 370®, Bayer Healthcare, Berlin, Deutschland) in einem Volumen von 0,6 ml verabreicht. Die Injektion erfolgte automatisiert als Bolus über eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatus PHD2000 series, Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA) mit einer Geschwindigkeit von 7,2 ml/min über den Schwanzvenenkatheter, gefolgt von einem Bolus von 0,5 ml Kochsalzlösung.

Der gescannte Messbereich lag bei 38,4 mm, entsprechend der Detektorgröße, um einen Tischvorschub zu vermeiden. Der Dual-Source-CT-Scanner wurde im Dual Energy-Modus betrieben. Die beiden Röntgenröhren-Spannungen lagen bei 80 kV und 140 kV. Die Stromstärke betrug an beiden Röntgenröhren 200 mAs. Die räumliche Auflösung betrug  $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$ , die rekonstruierte Schichtdecke 1,0 mm, so dass 38 rekonstruierte Schichtbilder pro Zeiteinheit vorlagen. Die zeitliche Auflösung betrug 1 s, so dass insgesamt 90 Datensätze akquiriert wurden. Für die Bildrekonstruktion wurde ein weicher Kernel (B31f) verwendet um das Bildrauschen zu verringern.

### 2.2.1 Kontrastmittel

Das Kontrastmittel Iopromid (Ultravist 370®, Bayer Healthcare, Berlin, Deutschland) ist ein wasserlösliches, nicht-ionisches, niedermolekulares, jodhaltiges Kontrastmittel mit einem Molekulargewicht von 791,12 g/mol (s. Abbildung 5). 1 ml der verwendeten Injektionslösung enthält 769 mg Iopromid, entsprechend 370 mg gebundenem Jod [35]. Jod (Atomzahl Z=53) ist verantwortlich für die hohe Absorption der Röntgen-Strahlen und erzeugt so den Kontrast im Vergleich zu nicht-anreicherndem Gewebe und Flüssigkeiten. Iopromid wird in der klinischen Routine vielfältig eingesetzt. Es findet neben der kontrastverstärkten Computertomographie beispielsweise auch bei der Angiographie oder der endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) Verwendung. Iopromid verteilt sich nach intravenöser Anwendung sehr schnell im Extrazellularraum wodurch die Plasmakonzentration rasch absinkt. Es wird nicht metabolisiert, überwindet unter physiologischen Bedingungen nicht die Blut-Hirn-Schranke und wird fast vollständig renal eliminiert. Die terminale Halbwertszeit beträgt in etwa 2 Stunden. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz verlängert sich die Halbwertszeit aufgrund der reduzierten glomerulären Filtrationsrate. [35]

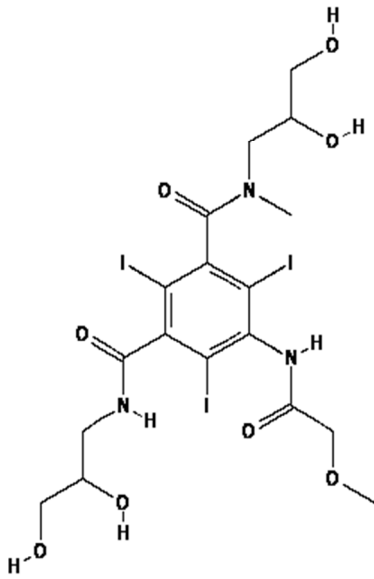


Abbildung 5: Strukturformel des Kontrastmittels Iopromid, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>I<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>,

Quelle: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

### 2.2.2 DCE-Computertomographie

Die Perfusionsbildgebung mit DCE-CT ist ein Verfahren der funktionellen Bildgebung. Sie erlaubt die Quantifizierung hämodynamischer Prozesse im Gewebe. Voraussetzung ist die kontinuierliche Akquisition von Bildern vor, während und nach der intravenösen Kontrastmittelgabe, die nach pharmakokinetischer Analyse eine Quantifizierung verschiedener Parameter der Tumormikrozirkulation ermöglicht. In der vorliegenden Studie wurden drei unabhängige Parameter der Gewebepfusion ermittelt.

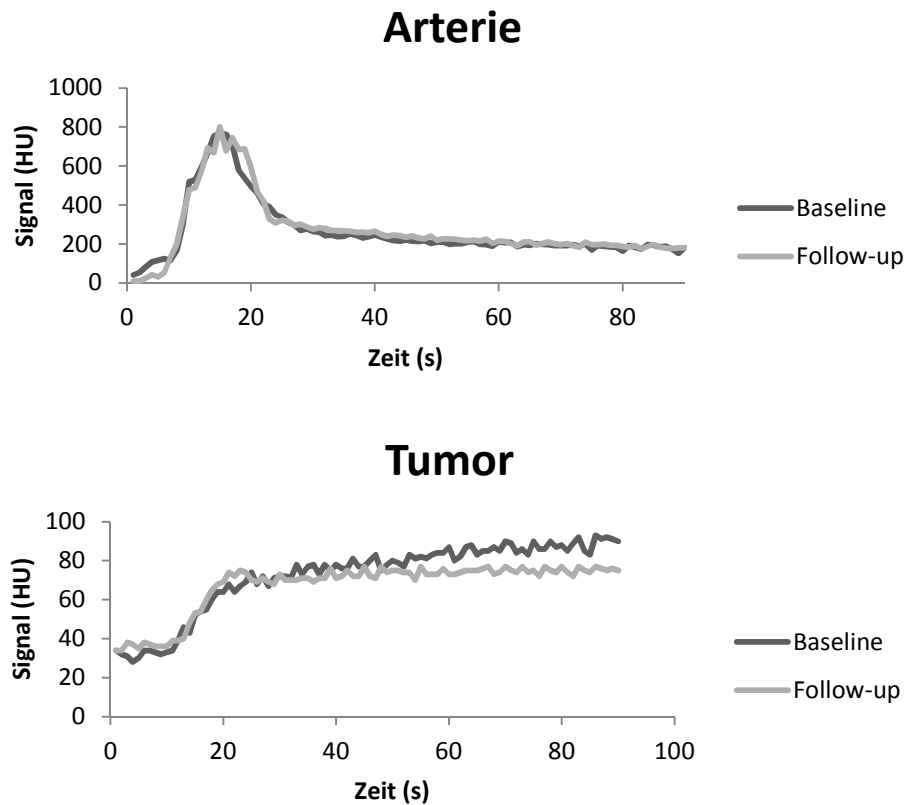
- **Plasmafluss (PF)** in mL/100mL/min als Parameter der Tumorperfusion
- **Plasmavolumen (PV)** in mL/100mL oder % als Parameter der Tumorvaskularisation

- **Permeability-Surface Area Product (PS)** in mL/100mL/min als Parameter der endothelialen Permeabilität der Tumorkapillaren

Die Berechnung dieser Parameter erfolgt in zwei konsekutiven Schritten:

- 1.) Die Kontrastmittelkonzentration wird in Form von Zeit-Konzentrationskurven (s. Abbildung 6) in einer zuführenden Arterie und im Tumorgewebe bestimmt
- 2.) Anhand dieser Signalverläufe werden mit Hilfe von kinetischen Modellen die entsprechenden hämodynamischen Parameter berechnet.

Die Datennachbearbeitung und Auswertung erfolgte an einem externen Rechner mit PMI-Software (Version 0.4). PMI ist eine Software, welche mit IDL Version 8.3 (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO) im Josef Lissner Laboratory for Biomedical Imaging an der Klinik und Poliklinik für Radiologie des Klinikums der Universität München entwickelt wurde [36].



**Abbildung 6:** Repräsentative Kurven der Signalintensität (HU) über die Zeit (s) in der Arterie (oben) und im Tumor (unten), jeweils in der Baseline- und Follow-up-Messung in einem exemplarischen Therapietier. Man beachte hier die unterschiedlichen Kurvenverläufe im Tumor zwischen Baseline und Follow-up.

Voraussetzungen für die Berechnung der Kontrastmittelkonzentration im Gewebe sind die Annahme einer Linearität und Stationarität [37, 38]. Linearität bedeutet, dass die Gewebeantwort stets proportional zur injizierten Dosis ist und Stationarität bedeutet, dass die Gewebeantwort unabhängig vom Zeitpunkt der Injektion ist [39].

$$c(t) = k \cdot (S(t) - S_0) \quad (1)$$



Hier beschreibt  $S_0$  das Signal vor der Kontrastmittelgabe,  $S(t)$  das Signal zum Zeitpunkt  $t$ .  $k$  stellt eine Konstante dar, dessen Wert in der CT gewebeunabhängig ist [40]. So lässt sich aus der Signaländerung direkt die Konzentration des Kontrastmittels berechnen. Die zeitabhängige Gewebekonzentration  $c_t(t)$  berechnet sich aus der Faltung der zeitabhängigen Konzentration in einem zuführenden Blutgefäß mit einer Residualfunktion.

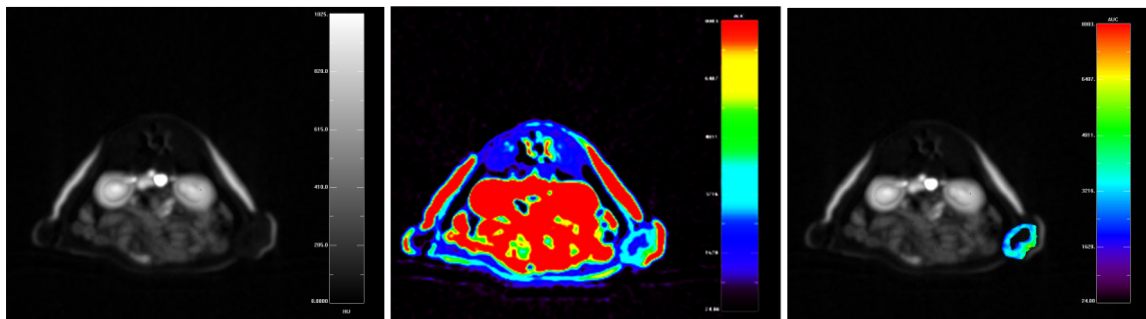
$$c_t(t) = F_p \cdot R(t) * c_a(t) \quad (2)$$

In dieser Gleichung beschreibt  $F_p$  den Plasmafluss und  $c_a(t)$  die arterielle Kontrastmittelkonzentration im Plasma, die als sogenannte Arterial Input Function (AIF) direkt in der Aorta gemessen wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Region of Interest (ROI) in das zentrale Lumen der Aorta eingezeichnet (4 x 4 Pixel).  $c_a$  ist die Konzentration im Blutplasma, die durch die Formel 3 aus der Konzentration im Blut  $c_b$  berechnet wurde. Für den Hämatokrit (Hkt) wurde ein Wert von 0,45 angenommen [37, 41].

$$c_a = \frac{c_b}{1-Hkt} \quad (3)$$

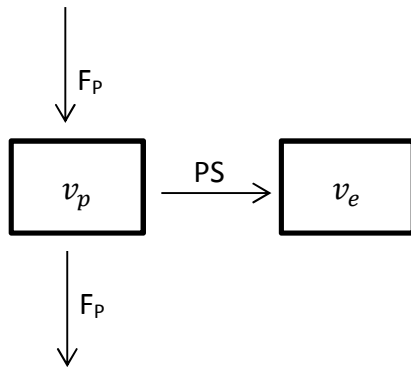
Um die kinetischen Analysen zu standardisieren und die Untersucher-Abhängigkeit zu minimieren wurden semi-quantitative Karten zur Identifikation von vitalem Tumorgewebe erstellt. Area under the curve/Maximum of the curve (AUC/max) stellt hierbei einen semiquantitativen Parameter dar, der im direkten Zusammenhang mit dem Plasmavolumen steht. Dieser Parameter erlaubt damit eine gute Abschätzung zwischen vitalen und

nekrotischen Tumorarealen. Es wurden ringförmige Regions of Interest (ROI) über der Tumorperipherie gewählt (s. Abbildung 7), da in Studien gezeigt werden konnte, dass diese repräsentativ für vitales Tumorgewebe ist. Die Tumorperipherie ist weniger anfällig für einen erhöhten interstitiellen Druck und Nekrosen mit konsekutiv veränderter Kontrastmitteldynamik, wie sie im Tumorzentrum auftreten können [42].



**Abbildung 7:** Exemplarische axiale CT-Bilder eines Versuchstieres mit dem Tumorxenograft über der linken Flanke. Links: Maximum of the curve, Mitte: Area under the curve, Rechts: ausgewählte ROI. Man beachte die ringförmige Form entsprechend des vitalen Tumorgewebes.

Für die Berechnung von PF, PV und PS wurde das Two-compartment-uptake Modell verwendet, welches in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Bei diesem Modell wird angenommen, dass sich das Kontrastmittel in den beiden Kompartimenten Blutgefäß und Interstitium verteilt. Da das jodhaltige Kontrastmittel ausschließlich extrazellulär bleibt, kann auf ein drittes, intrazelluläres Kompartiment bei der Berechnung verzichtet werden.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Two-compartment-uptake. Das Kontrastmittel verteilt sich mit einem bestimmten Plasmafluss ( $F_p$ ) im intravasalen Volumen  $v_p$  und verlässt dieses über die Gefäßwand in den extravasalen Raum ( $v_e$ ), abhängig von dem Ausmaß der Permeabilität  $PS$

Der Transport des niedermolekularen Kontrastmittels im Plasma und die Verteilung auf die beiden Kompartimente kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$V_e \frac{dc_e(t)}{dt} = PS c_p(t) \quad (4)$$

$PS c_p(t)$  beschreibt den Fluss des Kontrastmittels vom Gefäß in das Interstitium [38, 39, 43].

### 2.2.3 DE-Computertomographie

Bereits 1976 legten Alvarez und Macovski den Grundstein für die Entwicklung der Dual-Energy-Computertomographie, in dem sie das Potential erkannten welches in der Generierung polychromatischer Röntgenspektren steckt. Avrin und Macovski verfolgten den Gedanken weiter und zeigten, dass man durch das Zerlegen der Daten in die Compton-

Streuung und den Photoelektrischen Effekt in der Lage ist, Materialien im Körper zu differenzieren [44]. Die geringe räumliche Auflösung der frühen CT-Geräte und die lange Akquisitionszeit verhinderten jedoch zunächst eine Verbreitung der Technik in der klinischen Anwendung.

Das erste CT-Gerät, welches zwei Röntgenröhren und zwei Detektoren enthielt wurde im Jahr 2005 von der Firma Siemens vorgestellt und war ab 2006 kommerziell erhältlich. Die klinische Einführung erfolgte zunächst vor allem aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung zur Verbesserung der kardialen Bildgebung [45-47]. Durch die Möglichkeit die beiden Röntgenröhren mit zwei unterschiedlichen Energiespektren zu betreiben, entsteht die DE-CT, welche die Materialdifferenzierung und –quantifizierung ermöglicht.

Heute wird die DE-CT für viele unterschiedliche klinische Anwendungen genutzt, zum Beispiel für die Bestimmung der Zusammensetzung von Harnleitersteinen [27], für die Differenzierung von Nierenraumforderungen [28, 48] oder für die Quantifizierung des Kalziumgehalts in den Koronararterien [29, 49]. Von zunehmendem Interesse ist die DE-CT auch in der onkologischen Bildgebung, da mit ihrer Hilfe sowohl morphologische als auch funktionelle Aspekte des Tumors beurteilt werden können. Ein großer Vorteil liegt in der Möglichkeit ein virtuelles Bild ohne Kontrastmittel zu erstellen [50]. Im Gegensatz zu einer einzelnen Aufnahme mit der kontrastverstärkten Computertomographie bei einem Energieniveau kann durch die Erstellung des virtuellen Bildes ohne Kontrastmittel zwischen einer Anreicherung des Kontrastmittels und einer Einblutung unterschieden werden [30].

Die Bildentstehung in der CT beruht vor allem auf zwei Prinzipien: dem Photoeffekt und der Compton-Streuung. Beim Photoeffekt handelt es sich um eine Absorption der Strahlung durch das durchstrahlte Gewebe. Das Photon gibt dabei seine Energie an ein Elektron der inneren Elektronenhülle ab und löst dieses aus der Elektronenhülle heraus. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigeren Energien auf, welche nur geringfügig höher ist als die Bindungsenergie des Elektrons. Wie Gleichung 5 zeigt, ist der Absorptionskoeffizient  $\mu_p$  abhängig von der Dichte  $\rho$ , der Ordnungszahl  $Z$  sowie der Energie der Röntgenstrahlung  $E$ . Der Exponent  $n$  wird für leichte Elemente auf  $n = 4,5$ , für schwere Elemente auf  $n = 4$  gesetzt:

$$\mu_p \propto \rho \cdot \frac{Z^n}{A \cdot E^3} \approx \rho \cdot \frac{Z^{n-1}}{E^3} \quad (5)$$

Der Photoeffekt ist somit besonders ausgeprägt bei niedrigen Energien und einer hohen Ordnungszahl des durchstrahlten Elements [51-53].

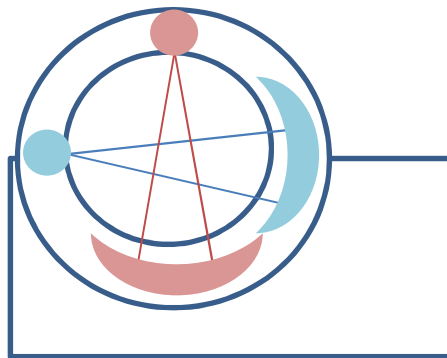
Bei der Compton-Streuung handelt es sich um einen Streueffekt, welcher bei Auftreffen des Photons auf die durchstrahlte Materie auftritt. Wenn die Bindungsenergie des Elektrons deutlich kleiner als die eintreffende Energie des Photons ist, wird ein Elektron aus der äußeren Hülle herausgeschlagen, und Elektron und Photon fliegen in einem definierten Winkel weiter. Der Comptonstreukoeffizient ist proportional zu dem Verhältnis von Ordnungszahl ( $Z$ ) zur Massenzahl ( $A$ ) =  $Z/A$  des Absorbers. Da in den meisten leichten

Elementen das Verhältnis  $Z/A = 1/2$  ist, ist die Compton-Streuung somit weitestgehend von der Ordnungszahl unabhängig. Die Energieabhängigkeit der Compton-Streuung ist, wie aus Gleichung 6 ersichtlich ist, ebenfalls vernachlässigbar gering ( $n = 0,5 - 1$ ) [53].

$$\mu_c = \rho \cdot \frac{Z}{A} \cdot \frac{1}{E^n} \quad (6)$$

Die DE-CT macht sich die Material- und Energieabhängigkeit des Photoeffekts im Gegensatz zur Compton-Streuung zunutze. Die DE-CT ist in der Lage aufgrund des unterschiedlichen Schwächungsverhaltens von Stoffen bei unterschiedlichen Energien, Materialien zu differenzieren. Dieses gelingt aufgrund des photoelektrischen Effekts vor allem bei Elementen mit hohen Ordnungszahlen. Bei der DE-CT werden zwei Datensätze mit unterschiedlichen Röntgenspektren generiert. Es gibt verschiedene technische Ansätze, die beiden Datensätze zu akquirieren. Es besteht zum einen die Möglichkeit die Datensätze sequenziell zu akquirieren, zum anderen können die Spannungen an einer Röntgenröhre schnell gewechselt werden (rapid voltage switching). Beide Methoden haben den Nachteil einer hohen Akquisitionszeit und den Einfluss von Bewegungsartefakten zwischen den Aufnahmen. Als weitere Möglichkeit können zwei Röntgenröhren in einen Computertomographen eingebaut werden, welche simultan mit unterschiedlichen Spannungen betrieben werden [26]. Hierdurch wird die Akquisitionszeit nicht verlängert und es treten keine Bewegungsartefakte zwischen den Messungen auf. In der vorliegenden Studie wurde die letztgenannte Methode verwendet: das Somatom Definition Flash® ist ein

sogenannter Dual Source Computertomograph mit zwei rotierenden, um  $90^\circ$  versetzten Röntgenröhren und entsprechend zwei gegenüberliegenden Detektoren (s. Abbildung 9). Diese können sowohl mit der gleichen Spannung, als auch mit unterschiedlichen Röhrenspannungen betrieben werden. Üblicherweise verwendet man Röhrenspannungen von 80 und 140 kV, da hier die Röntgenspektren einen möglichst großen Unterschied aufweisen und so die Materialdifferenzierung am besten gelingt [26].



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung einer Gantry eines Dual-Source-Computertomographen mit zwei, um  $90^\circ$  versetzten, Röntgenröhren (Kreis) und gegenüberliegenden Detektoren (Ellipse). Die blaue Röntgenröhre wird mit 80 kV Spannung und die rote mit 140 kV Spannung betrieben.

Da die Materialdifferenzierung besonders gut bei Elementen mit einer hohen Ordnungszahl gelingt, wird hierfür häufig Jod (Ordnungszahl 53) verwendet.  $^{53}\text{Jod}$  findet bereits seit langem eine breite Anwendung in der radiologischen Diagnostik, zum Beispiel als Kontrastmittel in der DCE-CT [54].

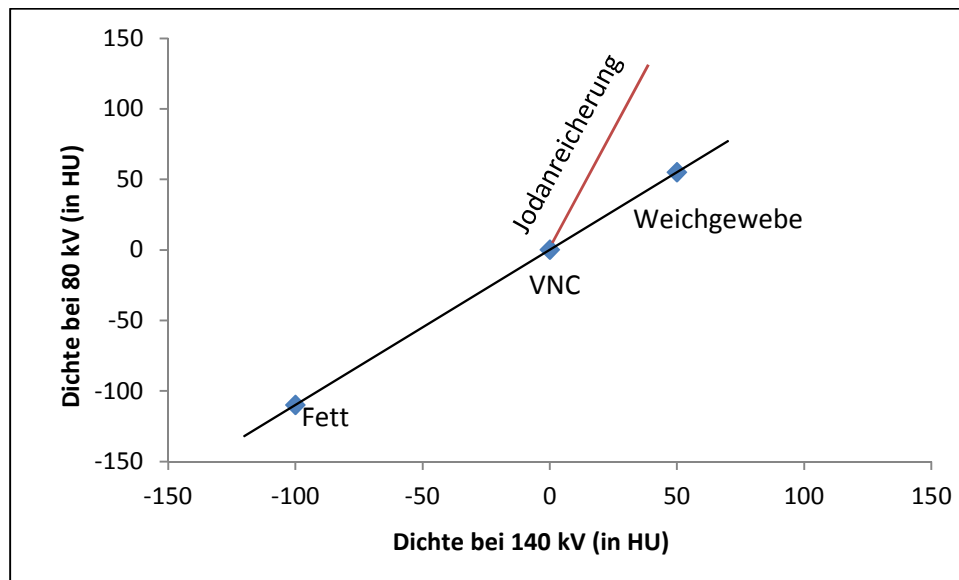
Ausgangspunkt für die Materialdifferenzierung sind zwei Basismaterialien (Fett und Weichgewebe), deren Messwerte sowohl für die hohe als auch für die niedrige Energie bekannt sind. Mit Hilfe der in Formel dargestellten 2-Materialzerlegung kann jeder Punkt als

linearer Zusammenhang zwischen den zwei bekannten Materialien beschrieben werden (s. Abbildung 10).

$$x_{80,140} = f x_{Fett\ 80,140} + (1 - f) x_{Weichgewebe\ 80,140} \quad (7)$$

Durch die Zugabe von Kontrastmittel ändert sich die Gleichung wie folgt:

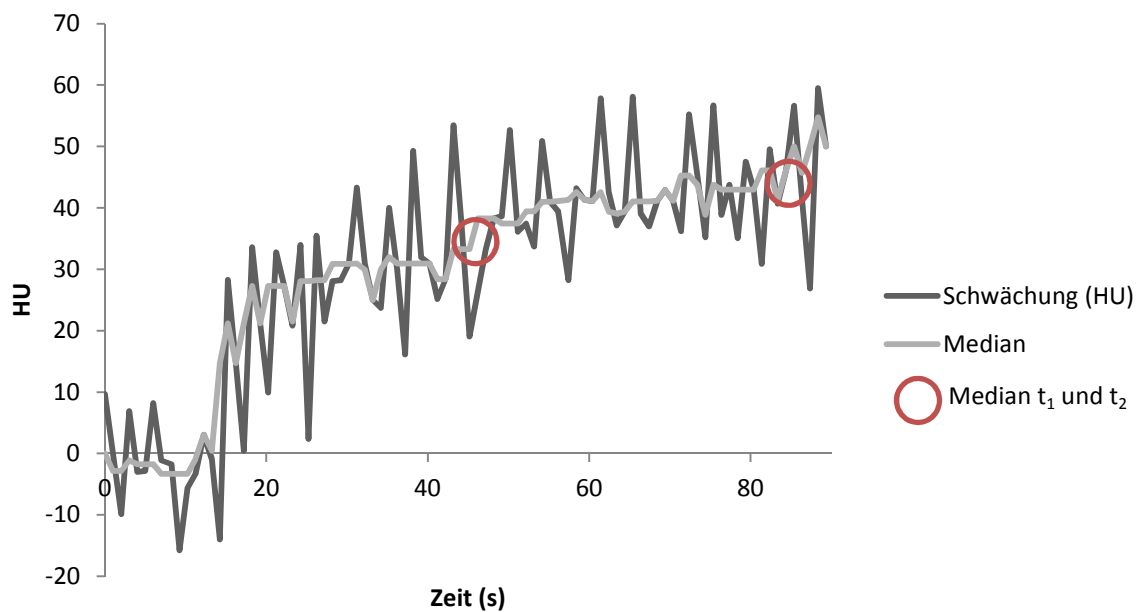
$$x_{80,140} = f x_{Fett\ 80,140} + (1 - f) x_{Weichgewebe\ 80,140} + \rho x_{Jod\ 80,140} \quad (8)$$



**Abbildung 10: Dreimaterialzerlegung (VNC = virtual non-contrast = virtuell nicht kontrastiert).** Man beachte den linearen Zusammenhang der zwei Basismaterialien in Form einer Gerade, welcher sich durch die Zugabe von Jod verändert.



Für die Auswertung wurden die gleichen ROIs verwendet, wie bei der Perfusionsauswertung. In Studien, die DE-CT Biomarker für das Monitoring antiangiogenetischer Therapien untersuchten, wurden Messungen 60, 70 oder 90 Sekunden nach Kontrastmittelapplikation durchgeführt [31, 32, 55]. In dieser Studie wurden zwei verschiedene Zeiträume ausgewählt, jeweils gemittelt aus fünf Zeitpunkten ( $t_1 = 45. - 49. \text{ Sekunde}$ ;  $t_2 = 80. - 85. \text{ Sekunde}$ ), um so das Bildrauschen im Kleintiermodell im klinischen CT zu reduzieren und einen geeigneten Zeitpunkt zu ermitteln (s. Abbildung 11). Ziel war es, einen optimalen Zeitpunkt für eine Single Shot DE-CT-Messung zu finden.



**Abbildung 11: Jodanreicherung im Tumor über die Zeit (HU) mit den Medianen von jeweils fünf gemittelten Messwerten  $t_1$  und  $t_2$ , exemplarisch in der Baseline-Messung eines Therapietiers.**

### 2.2.4 Tumordurchmesser

Analog zu den RECIST 1.1-Kriterien [15], wurde der maximale Durchmesser des Tumors im axialen CT-Bild gemessen. Anschließend wurde die Veränderung zwischen der Baseline- und der Follow-up-Messung verglichen und statistisch ausgewertet (Wilcoxon-Rank-Test).

### 2.3 Immunhistochemie

Um die Therapieeffekte von Regorafenib auf die Kolonkarzinome zu validieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen als Referenzstandard herangezogen. Es wurden hierzu verschiedene Färbungen durchgeführt: HE-Färbungen (Hämatoxylin-Eosin) zur Beurteilung der Nekroseareale, CD31 (Cluster of Differentiation 31) zur Quantifizierung der mikrovaskulären Gefäßdichte (Microvascular Density, MVD), Ki-67 (Kiel 67) zur Quantifizierung der Tumorzellproliferation und TUNEL (Terminal Desoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) zur Quantifizierung der apoptotischen Zellen. Es konnten so immunhistochemisch die antiangiogenetischen, antiproliferativen und proapoptotischen Effekte von Regorafenib untersucht werden.

Zur immunhistochemischen Aufarbeitung wurden die Tumore nach Euthanasie der Ratten exzidiert, in 10%igem Formalin (Sigma, Steinheim, Deutschland) für 48 h fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Einbettung des Gewebes in Paraffin wurde das Formalin zunächst unter fließendem Leitungswasser für etwa 4 Stunden ausgewaschen. Im Anschluss daran wurde das Tumorgewebe in einem Gewebeeinbettautomaten (Thermo Scientific Microm

STP 120 Spin Tissue Processor, Waltham, MA) entwässert. Die Entwässerung erfolgte mit aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %). Der Alkohol wurde danach mit Hilfe eines Xylol-Ersatzes (Neo-Clear®, Merck, Darmstadt, Deutschland) entfernt. Die Temperatur betrug hierbei 45°C. Anschließend wurde das Gewebe für 2 x 1 Stunde in Paraffin (60 °C) getaucht. Zum Schluss wurde es in einer Gewebe-Ausgießstation (Leica EG1150 C, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) mit Paraffin ausgegossen. Mit einem Rotationsmikrotom (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) wurden Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Die Präparate wurden über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Zur Vorbereitung der Gewebeschnitte für die weiteren Färbungen wurden diese wieder entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger zunächst für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte in NeoClear® (Merck, Darmstadt, Deutschland), für 2 x 10 Minuten, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70%). Zum Schluss wurde das Gewebe in destilliertes Wasser getaucht, wodurch es wieder rehydriert wurde.

### **2.3.1 HE-Färbung**

Zur Anfertigung einer HE-Färbung wurden die entparaffinierten Präparate für 5 Minuten in Mayers Haemalaunlösung (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden sie zunächst in destilliertem Wasser und dann für 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Nach einer erneuten Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für die Gegenfärbung für wenige Sekunden in eine Eosinlösung (Roth, Karlsruhe,

Deutschland) gelegt. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 s in 80% Ethanol, 1 min in 96% Ethanol, jeweils zweimal 2 Minuten in 100% Ethanol) wurden die Schnitte entwässert und dann in NeoClear® (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte mit EuKitt® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) eingedeckt. Für die Auswertung wurden von jedem Gewebeschnitt 10 zufällige Fotos bei 200-facher Vergrößerung angefertigt und anschließend der prozentuale Nekroseanteil ermittelt.

### **2.3.2 Anti-CD31- und Ki-67-Färbung**

Zur Beurteilung der Gefäßdichte im Tumor wurde der polyklonale Kaninchen CD31-Antikörper (ab28364, 1:50, abcam, Cambridge, UK) verwendet, welcher an Endothelzellen bindet. Der Ki-67-Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (ab16667, 1: 100, abcam, Cambridge, UK) der an das Ki-67-Protein in Menschen, Ratten und Mäusen bindet. Das Ki-67-Protein befindet sich in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G(1), S, G(2), Mitose) an der Oberfläche der Chromosomen, ist jedoch in ruhenden Zellen (G(0)) nicht nachweisbar. Es stellt somit einen Marker für proliferierende Zellen dar. Sowohl die CD31- als auch die Ki-67-Färbungen wurden mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase- (PAP-) Technik durchgeführt. Zunächst erfolgte die Antigendemaskierung in Citratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle für 20 Minuten bei 600 W. Diese Demaskierung ist notwendig, da es durch die Formalinfixierung zu Proteinvernetzungen kommt, die durch den Puffer wieder aufgelöst werden können. Der Antikörper ist dadurch in der Lage an seine Epitope zu binden. Nach Waschen der Gewebeschnitte in destilliertem Wasser und in TBS-T (1 x Tris-buffered Saline mit 0.05% Tween), wurde die endogene Peroxidase blockiert (Dako EnVision+ System HRP

(DAB oder AEC), Dako, Hamburg, Deutschland). Danach wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert (Ki-67: 1:100, CD31 1:50). Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Dann wurden die Schnitte gewaschen und das Substrat AEC (aus Dako Envision Kit) bei der CD-31-Färbung, DAB Chromogen (aus Dako Envision Kit) bei der Ki-67-Färbung aufgetragen. Je nach Farbintensität erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte für 5 bis 30 Minuten. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 Sekunden und die Gewebeschnitte werden unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Danach wurden die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Deckgläsern eingebettet. Die Schnitte wurden mikroskopisch ausgewertet (Leica DM 2500®, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und die durchschnittliche Anzahl der CD31- bzw. Ki-67-positiven Zellen in zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung mit MATLAB R 2011a (MathWorks, Inc., Natick, MA) ermittelt.

### **2.3.3 TUNEL-Färbung**

Die TUNEL-Färbung dient der Darstellung der Apoptose, da die verwendete terminale Desoxyribosyl-Transferase an die freien 3'OH-Enden der DNA bindet, die durch Strangbrüche entstanden sind. Zunächst wurde das Gewebe, wie oben beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Die Demaskierung erfolgte mit Pepsin-Lösung für 30 Minuten bei 37°C und anschließender Inkubation in Citrat-Puffer für 20 Minuten im Wasserbad (100°C). Zum

Nachweis der Apoptose in den Gewebeschnitten wurde ein kommerziell erhältliches Labor-Kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet, welcher aus einer Enzym- und einer Färbelösung besteht. Unmittelbar vor der Färbung wurden 50 µl der Enzym-Lösung (Enzyme Solution) mit 450 µl der Färbelösung vermischt. Jeder Schnitt wurde dann mit 50 µl dieser Mischung für 60 Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 3 x für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit einem Eindeckmedium (VECTASHIELD® Mounting Media with DAPI, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA) eingedeckt und für eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Das Eindeckmedium enthielt als Zusatz DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welches der Färbung intakter Zellkerne diente - es zeigt eine blaue Farbe, im Gegensatz zu der charakteristischen grünen Fluoreszenzfarbe des TUNEL-Antikörpers. Die Gewebeschnitte wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 2500®, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einem Fluoreszenzfilter von  $520 \pm 20$  nm analysiert. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche Anzahl an apoptotischen Zellen in 10 zufälligen Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung angegeben.

### 2.4 Statistik

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Placebo-kontrollierte, randomisierte Studie. Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm SPSS (Version 21, IBM, Armonk, NY) verwendet. Auf Grund der geringen Tierzahl darf nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, so dass zur Auswertung nicht-parametrische Tests herangezogen

wurden. Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede zwischen Tag 0 und Tag 7 innerhalb der jeweiligen Gruppe wurde ein Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet. Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede der gemessenen Parameter zwischen Therapie- und Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Korrelation der Ergebnisse der DCE-CT- und DE-CT-Messungen und für die Korrelation zwischen den CT-Parametern und den immunhistochemischen Ergebnissen wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Messwerte werden im Folgenden mit jeweils zwei Dezimalstellen angegeben, die Mittelwerte (M) jeweils  $\pm$  Standardabweichung (SD).

### 3 Ergebnisse

Die DCE-CT-Messungen und die immunhistochemischen Untersuchungen wurden erfolgreich an n=15 Ratten durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten ohne unerwünschte Zwischenfälle und konnten an allen, in der Studie eingeschlossenen Tieren abgeschlossen werden.

#### 3.1 CT-Perfusionsparameter

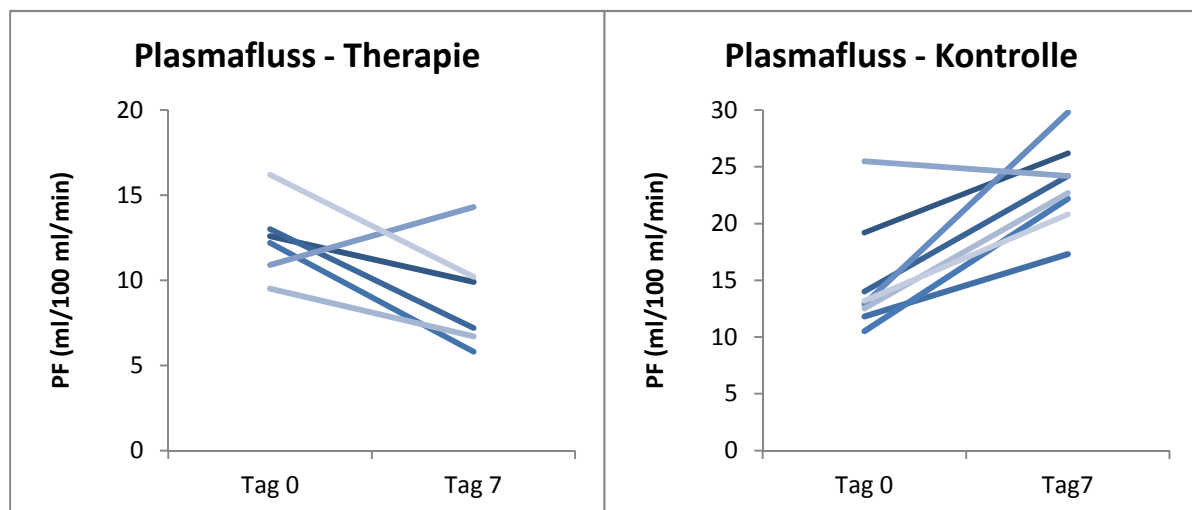
Bei der DCE-CT wurden drei Parameter der Tumormikrozirkulation bestimmt: PF als Parameter der Tumorperfusion, PV als Parameter der Tumervaskularisation, PS als Parameter der Endothelpermeabilität. An Tag 0 (Baseline) zeigten sich für keinen der drei Parameter signifikante Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. PF betrug an Tag 0  $12,8 \pm 2,3$  ml/100 ml/min in der Therapiegruppe vs.  $15,0 \pm 5,0$  ml/100 ml/min in der Kontrollgruppe ( $p = 0,54$ ). PV lag bei  $15,7 \pm 5,3$  % in der Therapiegruppe vs.  $14,1 \pm 3,6$  % in der Kontrollgruppe ( $p = 0,40$ ) und PS bei  $7,4 \pm 5,8$  ml/100 ml/min in der Therapiegruppe vs.  $4,8 \pm 3,6$  ml/100 ml/min in der Kontrollgruppe ( $p = 0,40$ ). In Tabelle 1 sind die individuellen Messwerte aller Tiere der Therapie- und Kontrollgruppe aufgeführt.



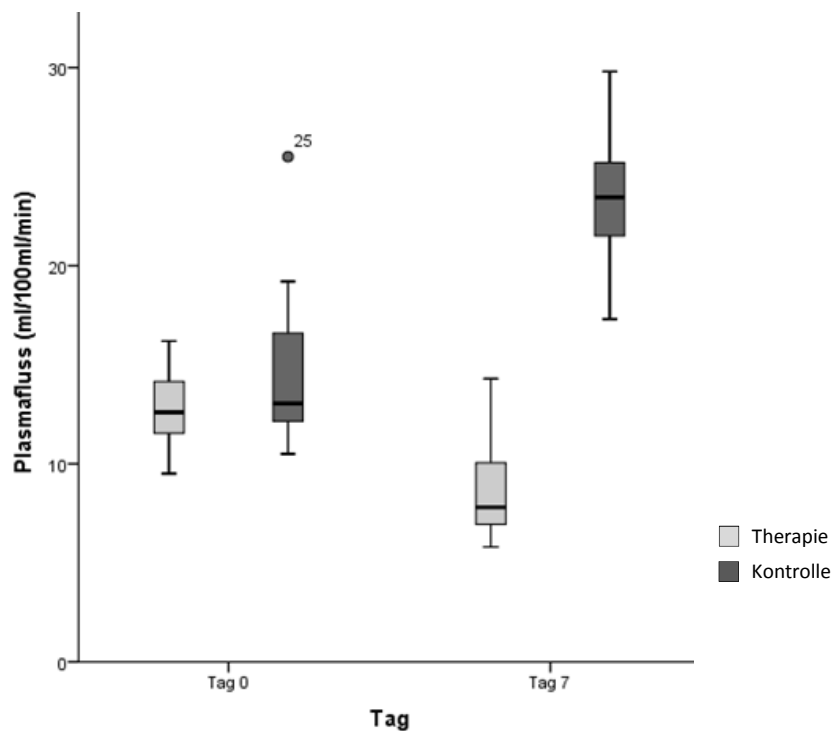
### 3.1.1 Plasmafluss

Der PF reduzierte sich in der Therapiegruppe nicht signifikant von  $12,8 \pm 2,3$  ml/100 ml/min an Tag 0 auf  $8,8 \pm 2,9$  ml/100 ml/min an Tag 7 ( $p = 0,06$ ). In der Kontrollgruppe stieg der PF signifikant von  $15,0 \pm 5,0$  ml/100 ml/min auf  $23,4 \pm 3,7$  ml/100 ml/min an ( $p = 0,02$ ).

Zudem zeigte sich ein signifikant niedrigerer PF in der Therapie-, als in der Kontrollgruppe in der Follow-up-Messung ( $8,8 \pm 2,9$  ml/100 ml/min vs.  $23,4 \pm 3,7$  ml/100 ml/min,  $p = 0,00$ ).



**Abbildung 12: Plasmafluss in der Therapie- und Kontrollgruppe. Man beachte die nicht-signifikante Abnahme in der Therapiegruppe links ( $p > 0,05$ ) im Gegensatz zum signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe rechts ( $p < 0,05$ ). In der Therapiegruppe kam es bei allen Tieren zu einer Abnahme des PF mit Ausnahme eines einzelnen Tieres, bei dem der PF anstieg.**



**Abbildung 13:** Boxplot-Diagramm des Plasmaflusses in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm stellt den signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe dar, sowie den signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bei der Follow-up-Messung.

### 3.1.2 Plasmavolumen

Das PV im Tumor verringerte sich im Laufe der einwöchigen Regorafenib-Therapie signifikant von  $15,7 \pm 5,3$  % auf  $5,5 \pm 3,5$  % ( $p=0,02$ ). In der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von PV zwischen Tag 0 und Tag 7 (Tag 0:  $14,1 \pm 3,6$ %; Tag 7:  $16,5 \pm 8,4$  %,  $p = 0,48$ ). In der Follow-up-Messung zeigte sich in der Therapiegruppe ein signifikant niedrigeres PV als in der Kontrollgruppe ( $5,5 \pm 3,5$  % vs.  $16,5 \pm 8,4$ ;  $p = 0,01$ ).

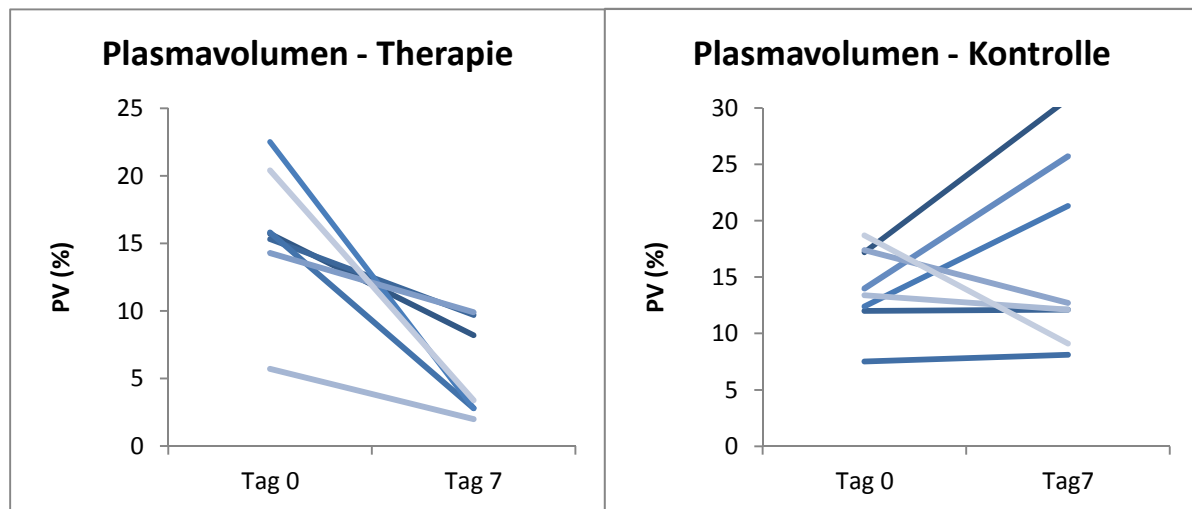


Abbildung 14: Plasmavolumen in der Therapie- und Kontrollgruppe. Es zeigt sich links ein signifikanter, unidirektionaler Rückgang des Plasmavolumens ( $p < 0,05$ ) in der Therapiegruppe, rechts hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Kontrollgruppe bei omnidirektionalem Verlauf der Einzelmesswerte.

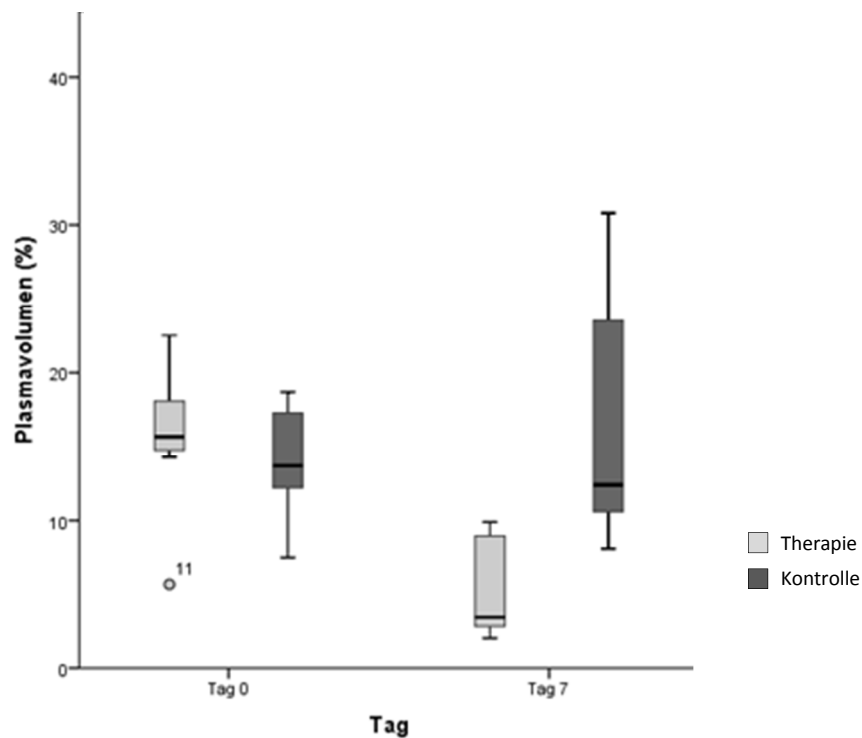
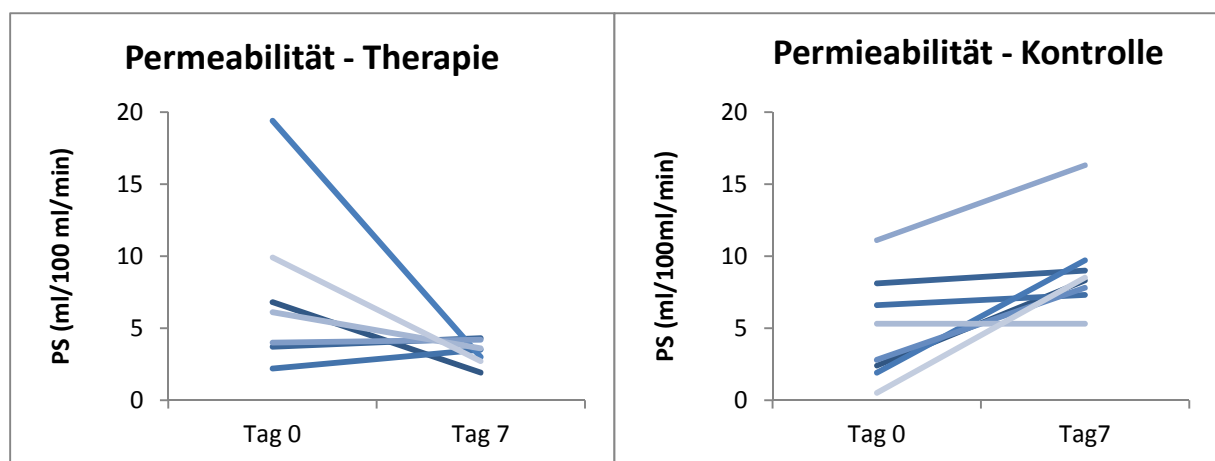


Abbildung 15: Boxplot-Diagramm des Plasmavolumens in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm zeigt die signifikante Reduktion von PV in der Therapiegruppe. Man beachte auch den signifikanten Unterschied an Tag 7 zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bei gleichen Ausgangsbedingungen an Tag 0.

### 3.1.3 Permeability-Surface Area Product

In der Therapiegruppe zeigte sich in der Tendenz eine Abnahme von PS von  $7,4 \pm 5,8$  ml/100 ml/min auf  $3,3 \pm 0,9$  ml/100 ml/min, diese war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,18$ ). In der Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Anstieg von PS zwischen Tag 0 ( $4,8 \pm 3,6$  ml/100 ml/min) und Tag 7 ( $9,0 \pm 3,2$  ml/100 ml/min) beobachtet werden ( $p = 0,02$ ). Der Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ergibt einen signifikanten Unterschied an Tag 7 ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 16:** PS in der Therapie- und Kontrollgruppe. Das linke Diagramm zeigt keine signifikanten Veränderungen in der Therapiegruppe bei omnidirektionalem Verlauf der Einzelmesswerte. Das rechte Diagramm zeigte einen signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe.

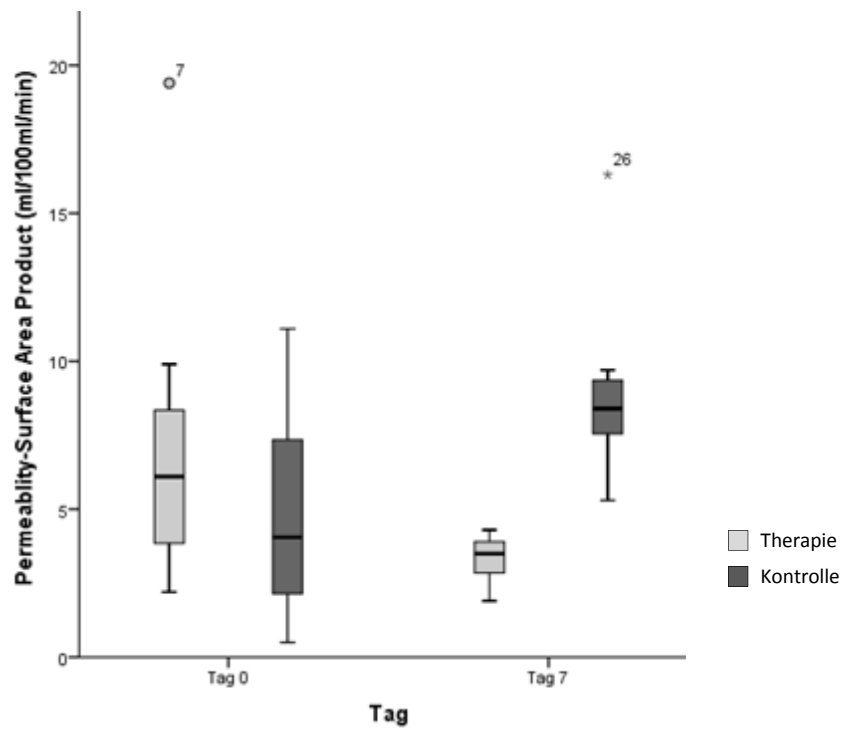


Abbildung 17: Boxplot-Diagramm von PS in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm zeigt den signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe sowie den signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe an Tag 7.

Tier-Nummer	PF (ml/100 ml/min)		PV (%)		PS (ml/100 ml/min)	
Therapie	Tag 0	Tag 7	Tag 0	Tag 7	Tag 0	Tag 7
1	12,6	9,9	15,7	8,2	6,8	1,9
2	13,0	7,2	15,3	9,7	3,7	4,3
3	12,2	5,8	15,8	2,8	2,2	3,5
4	15,3	7,8	22,5	2,8	19,4	3,0
5	10,9	14,3	14,3	9,9	4,0	4,2
6	9,5	6,7	5,7	2,0	6,1	3,6
7	16,2	10,2	20,4	3,4	9,9	2,7
Mittelwert	<b>12,8</b>	<b>8,8</b>	<b>15,7*</b>	<b>5,5*</b>	<b>7,4</b>	<b>3,3</b>
± SD	± 2,3	± 2,9	± 5,3	± 3,5	± 5,8	± 0,9
<b>Kontrolle</b>						
8	19,2	26,2	17,2	30,8	2,4	8,3
9	14,0	24,2	12,0	12,1	8,1	9,0
10	11,8	17,3	7,5	8,1	6,6	7,3
11	10,5	22,2	12,4	21,3	1,9	9,7
12	12,9	29,8	14,0	25,7	2,8	7,8
13	25,5	24,2	17,4	12,7	11,1	16,3
14	12,5	22,7	13,4	12,1	5,3	5,3
15	13,2	20,8	18,7	9,1	0,5	8,5
Mittelwert	<b>15,0**</b>	<b>23,4** #</b>	<b>14,1</b>	<b>16,5 #</b>	<b>4,8**</b>	<b>9,0** #</b>
± SD	± 5,0	± 3,7	± 3,6	± 8,4	± 3,6	± 3,2

**Tabelle 1:** Individuelle Werte aller Tiere von PF, PV und PS an Tag 0 und Tag 7 in der Therapie- und Kontrollgruppe.

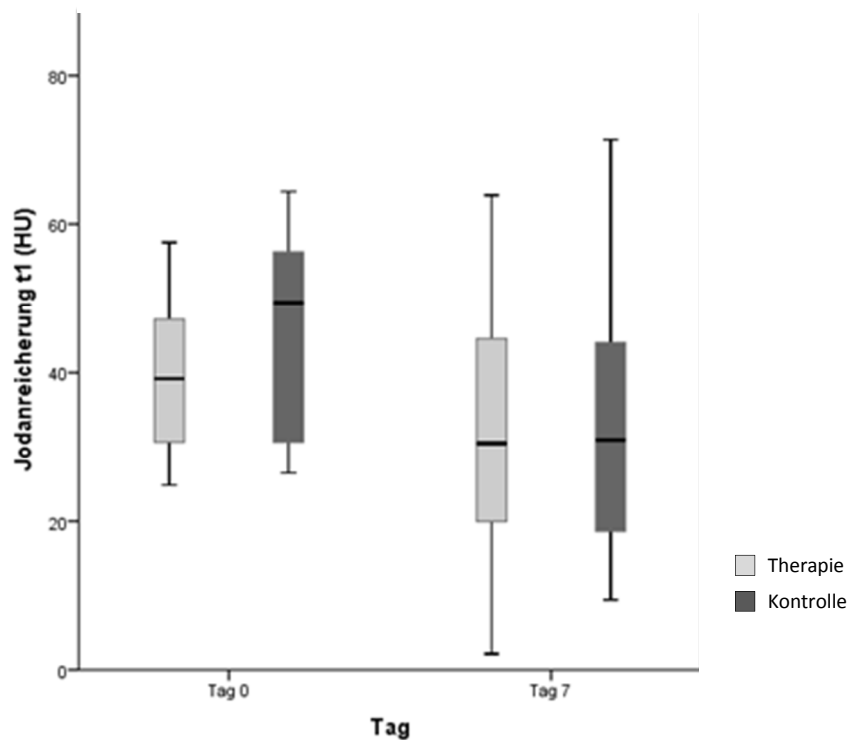
\*= signifikante Abnahme in der Therapiegruppe zwischen Tag 0 und Tag 7,  $p < 0,05$

\*\*= signifikante Zunahme in der Kontrollgruppe zwischen Tag 0 und Tag 7,  $p < 0,05$

# = signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe

### 3.2 Dual-Energy-Computertomographie

Es wurden pro Messung die Mediane aus zwei verschiedenen Messzeiträumen ( $t_1 = 45 - 50$  s;  $t_2 = 80 - 85$  s) gebildet und jeweils zwischen der Baseline- und der Follow-up-Messung verglichen. Bei  $t_1$  zeigten sich sowohl in der Therapie-, als auch in der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen. In der Therapiegruppe sank die jodbedingte Schwächung nicht signifikant von  $39,61 \pm 12,45$  HU auf  $31,72 \pm 22,78$  HU ( $p=0,24$ ), in der Kontrollgruppe von  $45,46 \pm 14,26$  HU auf  $33,99 \pm 18,02$  HU ( $p=0,07$ ). Bei  $t_2$  zeigten sich vergleichbare Resultate, hier jedoch mit signifikanter Abnahme der Jodanreicherung in der Kontrollgruppe von  $54,01 \pm 16,66$  HU auf  $38,97 \pm 17,25$  HU ( $p=0,05$ ), während sich in der Therapiegruppe der Jodgehalt im Tumor nicht signifikant von  $42,42 \pm 10,82$  HU auf  $34,59 \pm 22,05$  HU reduzierte ( $p=0,24$ ). Es zeigte sich beim Vergleich der Gruppen bei der Baseline-Messung bei beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied ( $t_1$ :  $p = 0,54$ ,  $t_2$ :  $p = 0,23$ ). Auch bei der Follow-up-Messung war kein signifikanter Unterschied erkennbar ( $t_1$ :  $p = 0,78$ ,  $t_2$ :  $p = 0,61$ ). Die Resultate sind graphisch als Boxplot für Median  $t_1$  dargestellt (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Boxplot-Diagramm der Jodanreicherung zum Zeitpunkt t1 für Therapie- und Kontrollgruppe. Es zeigen sich weder zwischen Tag 0 und Tag 7, noch zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede.

### 3.3 Tumordurchmesser

Der maximale Tumordurchmesser in axialer Schnittführung wurde in der Baseline-Messung und in der Follow-up-Messung bestimmt. Es zeigte sich, dass die Tumorgöße sowohl in der Therapie-, als auch in der Kontrollgruppe zugenommen hat. Diese Größenzunahme war in der Kontrollgruppe signifikant, in der Therapiegruppe nicht. Der Tumordurchmesser stieg in der Therapiegruppe von  $11,23 \pm 2,43$  mm auf  $11,37 \pm 2,06$  mm ( $p = 0,24$ ). In der Kontrollgruppe nahm der Tumordurchmesser von  $9,46 \pm 1,10$  mm auf  $11,53 \pm 2,29$  mm um 21,83 % signifikant zu ( $p = 0,017$ ) (s. Abbildung). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des maximalen Tumordurchmessers zwischen den Gruppen, weder bei der Baseline-Messung ( $p$



= 0,78), noch bei der Follow-up-Messung ( $p = 0,23$ ). Die individuellen Messergebnisse finden sich in der Tabelle 2.

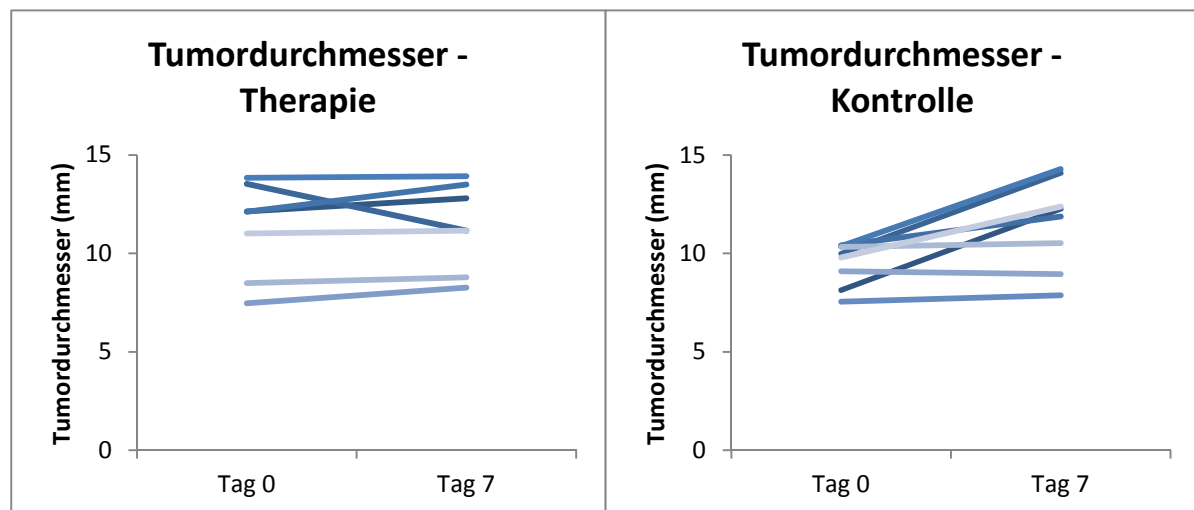


Abbildung 19: Veränderungen des Tumordurchmessers im Therapieverlauf in mm, links in der Therapiegruppe, rechts in der Kontrollgruppe. Es zeigt sich die signifikante Zunahme in der Kontrollgruppe, während sich in der Therapiegruppe keine signifikanten Änderungen ergaben.

Tier-Nummer	Tumordurchmesser (mm)		Prozentuale Veränderung (%)
Therapie	Tag 0	Tag 7	
1	12,14	12,82	+ 6
2	13,54	11,17	- 17
3	12,13	13,50	+ 11
4	13,84	13,93	+ 1
5	7,46	8,27	+ 11
6	8,50	8,79	+ 3
7	11,02	11,16	+ 1
Mittelwert	<b>11,23</b>	<b>11,37</b>	<b>+ 2</b>
± SD	± 2,43	± 2,05	± 10
<b>Kontrolle</b>			
8	9,99	14,09	+ 41
9	10,41	11,88	+ 14
10	10,36	14,29	+ 38
11	7,55	7,88	+ 4
12	9,09	8,95	- 2
13	10,34	10,52	+ 2
14	9,79	12,38	+ 26
15	9,65	11,43	+ 19
Mittelwert	<b>9,46*</b>	<b>11,53*</b>	<b>+ 22*</b>
± SD	± 1,10	± 2,29	± 20

**Tabelle 2: Individuelle Messergebnisse des Tumordurchmessers an Tag 0 und Tag 7 mit prozentualer Veränderung in der Therapie- und Kontrollgruppe.**

**\*p < 0,05**

### **3.4 Immunhistochemie**

Bei jedem der  $n = 15$  Messtiere wurden HE-Färbungen sowie 3 verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt: CD31, Ki-67 und TUNEL. Die individuellen Ergebnisse aus den verschiedenen immunhistochemischen Untersuchungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Abbildung 20 zeigt repräsentative Schnitte der immunhistochemischen Färbungen mit CD31, Ki-67 und TUNEL in Therapie- und Kontrollgruppe. Die Abbildungen 21-24 zeigen Boxplots der jeweiligen Färbung zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe.

Tier-Nummer	HE (%)	CD31 (Anzahl)	Ki-67 (Anzahl)	TUNEL (Anzahl)
<b>Therapiegruppe</b>				
1	21,6	93	7869	1442
2	11,5	74	5702	9612
3	16,2	86	4958	3845
4	9,6	143	3747	2564
5	19,7	138	3372	2317
6	6,6	117	3201	5313
7	20,9	126	5884	4728
8	14,1	126	3997	10953
Mittelwert	<b>15*</b>	<b>113*</b>	<b>4841</b>	<b>5097*</b>
± SD	± 6	± 25	± 1593	± 3463
<b>Kontrollgruppe</b>				
9	51,7	3770	14093	36
10	51,7	3796	8253	55
11	58,3	3320	9885	52
12	60,1	3860	10621	57
13	67,7	3707	17100	59
14	45,0	5776	11807	41
15	53,8	5709	11152	34
Mittelwert	<b>55,5*</b>	<b>4277*</b>	<b>11844</b>	<b>48*</b>
± SD	± 6	± 929	± 3206	± 11

**Tabelle 3: Individuelle Werte der immunhistochemischen Färbungen mit HE, Ki-67, TUNEL und CD31 in der Therapie- und Kontrollgruppe.**

**\* signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).**

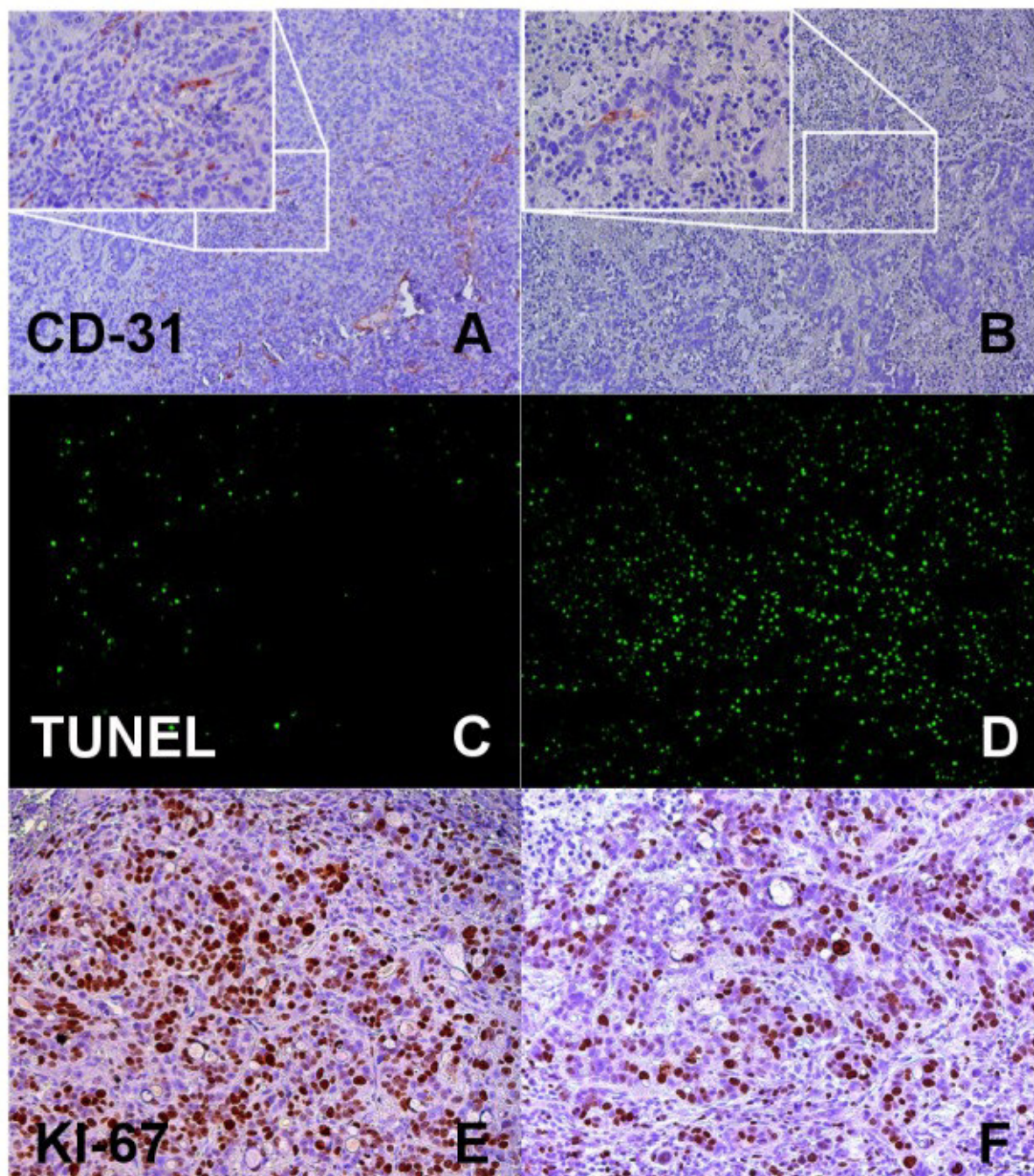


Abbildung 20: Repräsentative immunhistochemische Färbungen für die mikrovaskuläre Gefäßdichte (CD31, A und B), die Apoptose (TUNEL, C und D) und die Zellproliferation (Ki-67, E und F), links in der Kontrollgruppe, rechts in der Therapiegruppe. Man beachte die signifikant geringere Anzahl der CD31-positiven Zellen in der Therapiegruppe (B) und die signifikant höhere Anzahl an fluoreszierenden, apoptotischen Zellen in der TUNEL-Färbung in der Therapiegruppe (D), aus Cyran et al. [56].

### 3.4.1 HE

Bei der HE-Färbung zeigten sich in der Therapiegruppe signifikant höhere nekrotische Anteile als in der Kontrollgruppe ( $55,5 \pm 6 \%$  vs.  $15 \pm 6 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

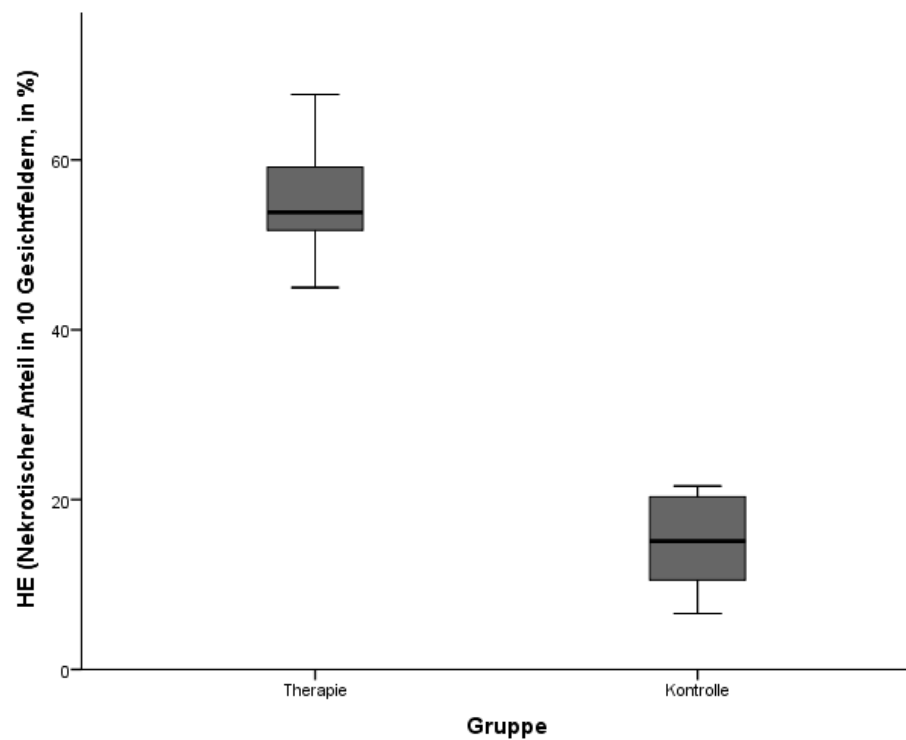


Abbildung 21: Boxplot-Diagramm der HE-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt den signifikant höheren Anteil an nekrotischen Zellen in der Therapiegruppe ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.2 CD31

Die Anzahl der CD31-positiven Zellen, als Maß für die mikrovaskuläre Gefäßdichte, war in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $48 \pm 10$  vs.  $113 \pm 25$ ;  $p < 0,01$ ).

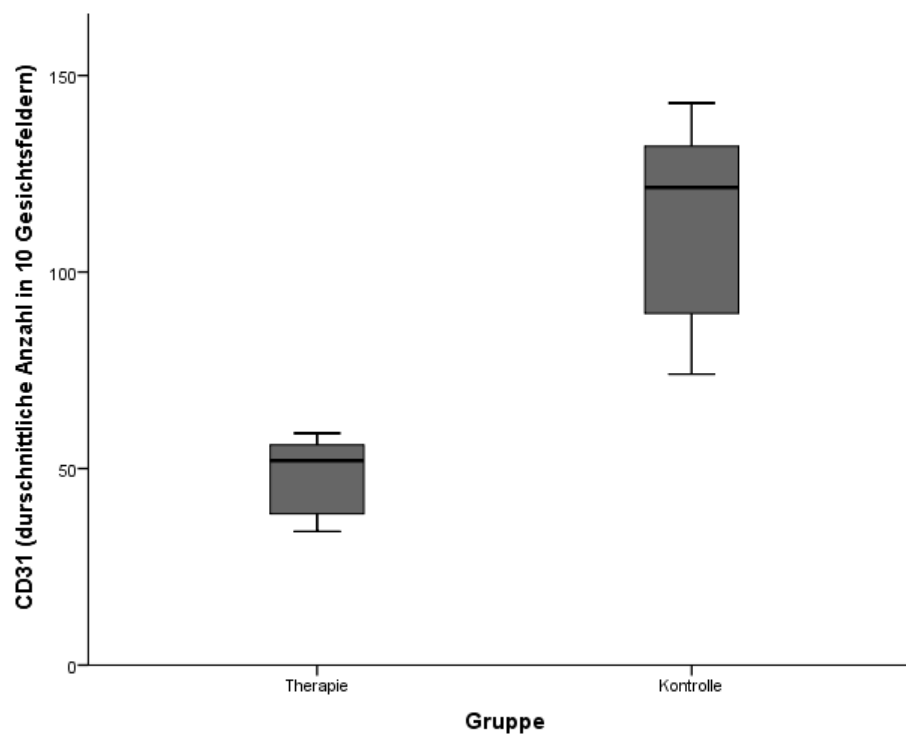


Abbildung 22: Boxplot-Diagramm der CD31-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt den signifikant niedrigen Anteil an Gefäßendothelzellen in der Therapiegruppe, entsprechend einer geringeren mikrovaskulären Gefäßdichte ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.3 Ki-67

Die Zahl der Ki-67-positiven Zellen, als Parameter der Zellproliferation, unterschied sich nicht signifikant in den Tumoren der Therapie- und der Kontrollgruppe ( $4277 \pm 1017$  vs.  $4841 \pm 1593$ ,  $p > 0,05$ ).

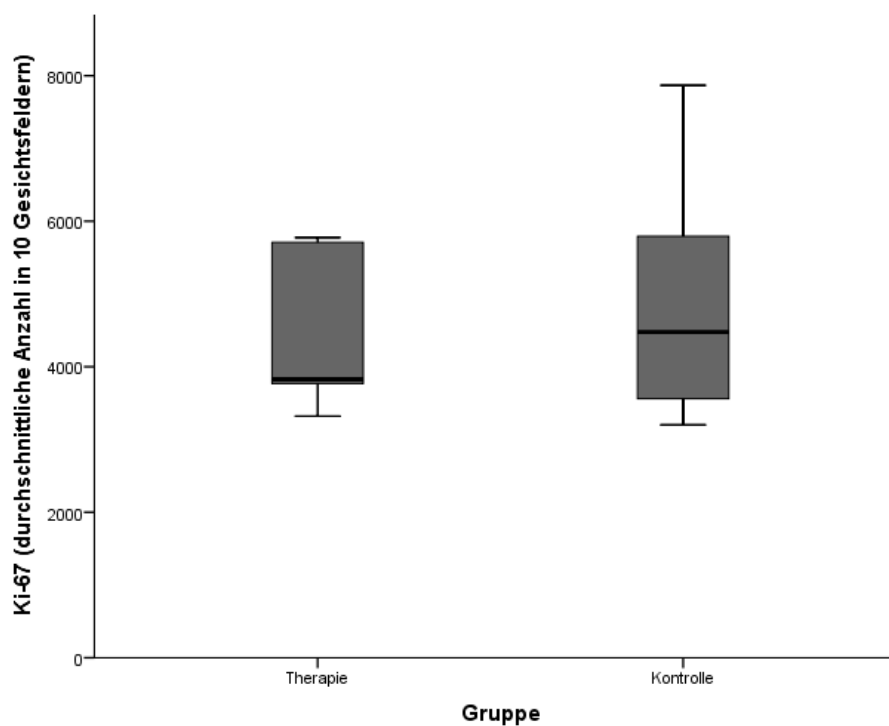


Abbildung 23: Boxplot-Diagramm der Ki-67-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Man sieht keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Ki-67-markierten Zellen zwischen den beiden Gruppen ( $p > 0,05$ ).



### 3.4.4 TUNEL

Die TUNEL-Färbung, als Nachweis apoptotischer Zellen, zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Regorafenib-therapierten und Placebo-therapierten Tumoren. In der Therapiegruppe ließen sich signifikant mehr DNA-Strangbrüche als Zeichen der Apoptose darstellen, als in der Kontrolle ( $11.844 \pm 2.927$  vs.  $5.097 \pm 3.463$ ,  $p < 0,05$ ).

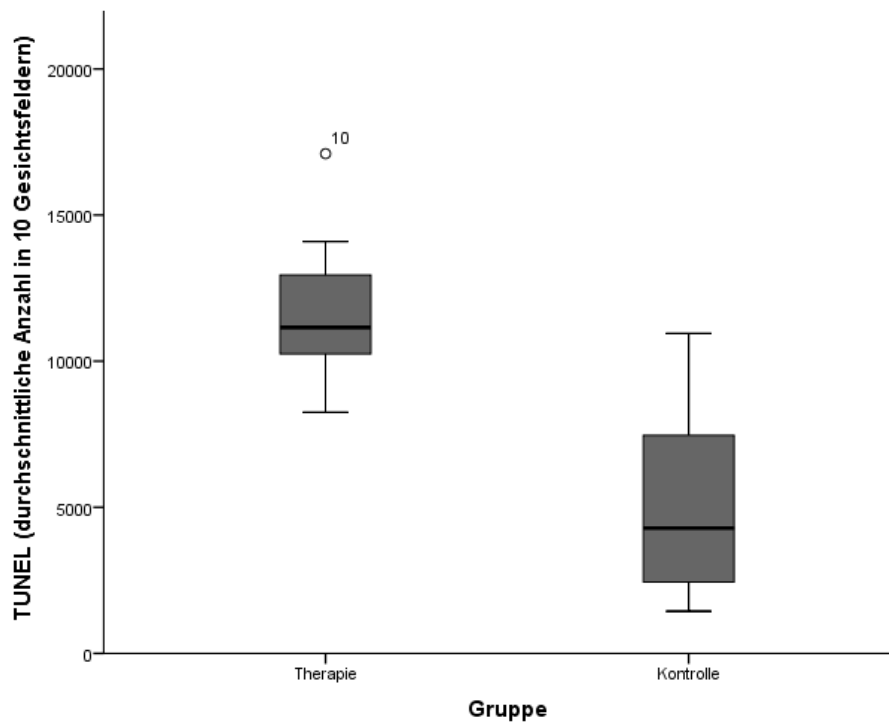


Abbildung 24: Boxplot-Diagramm der TUNEL-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Man sieht die signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen in der Therapiegruppe ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Korrelationen

#### 3.5.1 Korrelation zwischen CT und Immunhistochemie

Zu Validierungszwecken wurden die Parameter der DCE-CT und der DE-CT mit den Ergebnissen der Immunhistochemie korreliert. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind im Folgenden als Spearmans-Rho einschließlich Signifikanzen (zweiseitig) angegeben.

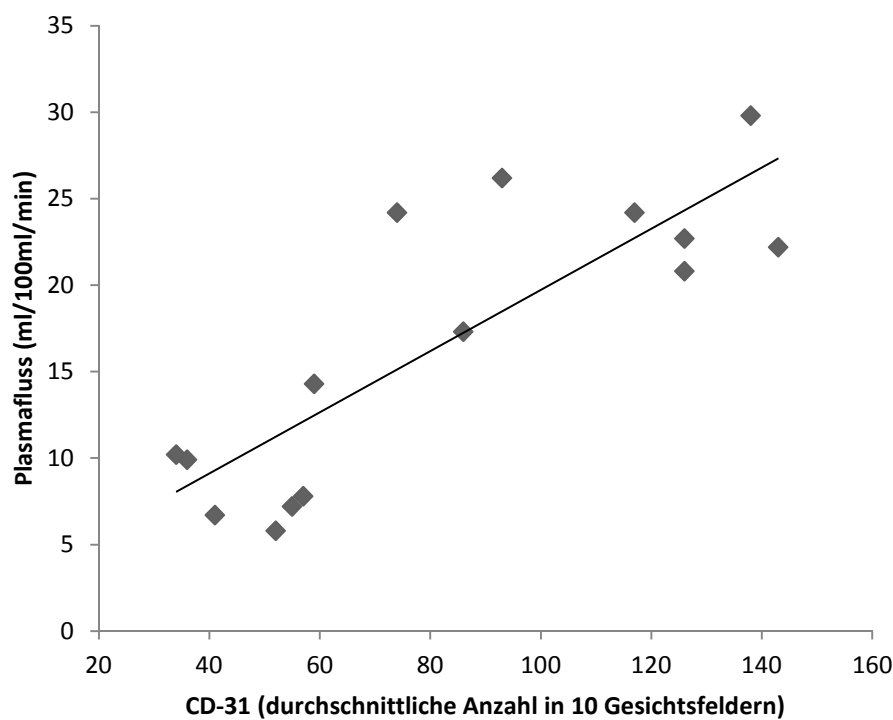
#### 3.5.2 DCE-CT/Immunhistochemie

PF, PV und PS der Follow-up-Messung wurden jeweils mit den Ergebnissen der HE-, CD31-, TUNEL- und Ki-67-Färbungen korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

	CD 31	Ki-67	TUNEL	HE
Plasmafluss (PF)	0,77**	0,08	-0,65**	-0,67**
Plasmavolumen (PV)	0,74**	-0,10	-0,68**	-0,55*
Permeability-Surface Area Product (PS)	0,82**	-0,10	-0,63**	-0,88**

**Tabelle 4: Spearman-Rangkorrelationkoeffizient  $\rho$  für die Korrelationen der Ergebnisse der DCE-CT-Messung mit der Immunhistochemie (\*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ).**

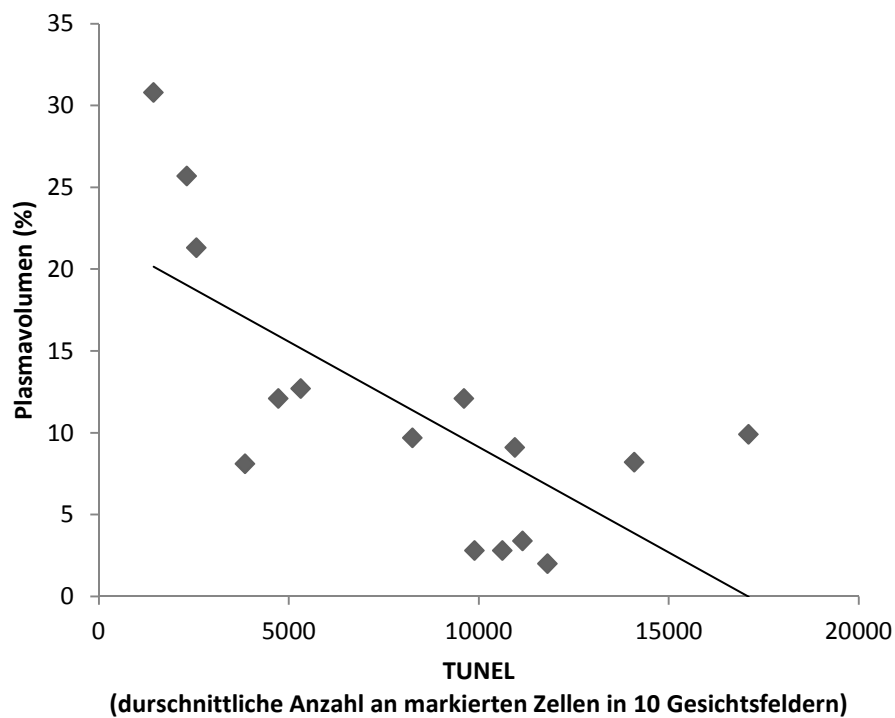
Der PF korrelierte dabei signifikant mit der Gefäßdichte in der CD31- ( $\rho = 0,77$ ,  $p < 0,01$ ) und invers mit der Anzahl apoptotischer Zellen in der TUNEL-Färbung ( $\rho = -0,65$ ,  $p < 0,01$ ) und mit der Anzahl nekrotischer Zellen in der HE-Färbung ( $\rho = -0,67$ ,  $p < 0,01$ ). Zwischen PF und Ki-67 konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden ( $\rho = 0,08$ ,  $p > 0,05$ ). Die Korrelation zwischen PF und CD31 ist graphisch in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25:** Das Streudiagramm zeigt die signifikante Korrelation zwischen dem Plasmafluss und der CD31-Färbung ( $p < 0,01$ ).

Das PV korrelierte ebenfalls signifikant mit den CD31- ( $\rho = 0,74$ ,  $p < 0,01$ ), den TUNEL- ( $\rho = -0,68$ ,  $p < 0,01$ ) sowie den HE-Färbungen ( $\rho = -0,55$ ,  $p < 0,05$ ) und nicht signifikant mit Ki-67 ( $\rho = -0,78$ ,  $p > 0,05$ ). Die Korrelation zwischen PV und der Anzahl an TUNEL-markierten Zellen

ist exemplarisch in Abbildung 26 dargestellt. Auch PS zeigte signifikante Korrelationen zu den Färbungen CD31 ( $\rho = 0,82$ ,  $p < 0,01$ ), TUNEL ( $\rho = -0,63$ ,  $p < 0,05$ ) und HE ( $\rho = -0,88$ ,  $p < 0,01$ ) und keine signifikante Korrelation zu der Ki-67-Färbung ( $\rho = -0,14$ ,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 26:** Das Streudiagramm zeigt die signifikante inverse Korrelation zwischen PV und der Zahl apoptotischer Tumorzellen ( $p < 0,01$ ).

### 3.5.3 DE-CT/Immunhistochemie

Auch die Ergebnisse der DE-CT wurden mit den Ergebnissen der Immunhistochemie korreliert. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Korrelationen zwischen der gemessenen jodbedingten Schwächung bei  $t_1$  und  $t_2$  und den immunhistochemischen Markern (s. Tabelle 5).

	CD31	Ki-67	TUNEL	HE
Jodaufnahme $t_1$	0,07	-0,37	-0,9	-0,07
Jodaufnahme $t_2$	0,23	0,40	-0,03	0,04

**Tabelle 5: Spearman-Rangkorrelationkoeffizient  $\rho$  für die Korrelationen der Ergebnisse der DE-CT-Messung mit der Immunhistochemie. Es konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden.**

### 3.5.4 Korrelation zwischen DCE-CT und DE-CT

Die CT-Perfusion zeigte in unserer Studie eine signifikante Reduktion von PF und PV in der Therapiegruppe. Zudem konnte ein signifikanter Anstieg des PF und der PS in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei der Jodquantifizierung mit DE-CT konnte ein Abfall der Jodanreicherung im Tumor sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Ergebnisse aus DCE-CT und DE-CT zeigten keine signifikanten Korrelationen untereinander (s. Tabelle 6).

	PF	PV	PS
Jodaufnahme $t_1$	-0,45	0,18	0,13
Jodaufnahme $t_2$	0,21	0,36	0,06

**Tabelle 6:** Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$  der Korrelationen der Perfusionsparameter der DCE-CT-Messung mit der jodbedingten Schwächung in der DE-Messung. Es konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden.

### 3.5.5 Korrelationen zwischen Tumordurchmesser und DCE-CT sowie Immunhistochemie

Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der ermittelten Tumorgroße und den Perfusionsparametern aus der DCE-CT festgestellt werden (s. Tabelle 7). Zudem zeigte sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Tumordurchmesser und den immunhistochemischen Färbungen (s. Tabelle 8).

	PF	PV	PS
Tumordurchmesser	0,12	-0,14	-0,01

**Tabelle 7:** Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$  für die Korrelation von Tumordurchmesser mit den Ergebnissen der CT-Perfusion. Es konnten dabei keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

	CD 31	Ki 67	TUNEL	HE
Tumordurchmesser	0,04	0,12	-0,37	-0,23

**Tabelle 8:** Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$  für die Korrelation von Tumordurchmesser mit den Ergebnissen der Immunhistochemie. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation ( $p > 0,05$ ).

---

## 4 Diskussion

In der Beurteilung des Therapieansprechens von soliden Tumoren galt lange die Messung der Größenveränderung als Methode der Wahl. In den letzten Jahren ist, mit zunehmender Einführung neuer, molekularer Medikamente, der Bedarf an nichtinvasiven Biomarkern für ein *in vivo* Monitoring gestiegen. Für die Beurteilung antiangiogenetischer Therapien bieten sich hier bildgebende Verfahren an, die eine nicht-invasive Quantifizierung funktioneller Parameter der Tumormikrozirkulation ermöglichen, da rein Morphologie-basierte Verfahren, wie RECIST, die frühen Therapieeffekte dieser Therapeutika oft nicht suffizient nachweisen können [17]. Neben der hier untersuchten CT sind zum Beispiel auch die MRT und die kontrastverstärkte Sonographie hierfür geeignet [21, 57]. Die großen Vorteile der CT gegenüber der MRT sind die flächendeckende Verfügbarkeit, die kurze Akquisitionszeit und die geringeren Kosten. Außerdem besteht keine Kontraindikation durch intrakorporales Fremdmaterial. Die Vorteile gegenüber der Sonographie liegen in der geringeren Untersucherabhängigkeit und in der damit besseren Reproduzierbarkeit. Ein Nachteil der CT ist die hohe Strahlenbelastung, welche insbesondere bei der Perfusionsmessung durch die lange Untersuchungsdauer und die hohe Anzahl an akquirierten Bildern hoch ist (durchschnittliche effektive Dosis einer CT-Untersuchung des Abdomens beim Menschen: 8-20 mSV [58]). Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit einer Jodapplikation, welche zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie einer Niereninsuffizienz oder einer allergischen Reaktion führen kann [35].

In dieser tierexperimentellen Studie wurde das Potenzial der DCE-CT und der DE-CT für das Monitoring einer Regorafenib-Therapie bei Kolonkarzinomen untersucht. Es konnte in der kontrastverstärkten CT gezeigt werden, dass es unter Regorafenib-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Tumormikrozirkulation kommt, validiert durch eine Auswahl immunhistochemischer Färbungen, die repräsentativ für zentrale Aspekte der Tumorpathophysiologie ausgewählt wurden. Der Plasmafluss, das Plasmavolumen und das Permeability-Surface Area Product korrelierten jeweils mit den Ergebnissen der CD 31-, TUNEL- und HE-Färbungen. Es konnten keine Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen und der Jodquantifizierung mit DE-CT und der Tumorgroße festgestellt werden.

Die DCE- und DE-Messungen erfolgten vor und nach einer siebentägigen Behandlung mit Regorafenib oder einer Placebolösung. Da die CT-Messungen für beide Verfahren in einer Sitzung durchgeführt wurden und die Bilder gleichzeitig akquiriert wurden, bestehen identische Bedingungen, die nicht durch unterschiedliche Positionen, Bewegungen oder Herzminutenvolumina verfälscht wurden. Die Unterschiede in den Messergebnissen sind somit allein auf die Methode und die Nachbearbeitung zurückzuführen.

### **4.1 DCE-CT als Biomarker für ein Therapieansprechen**

Mit der DCE-CT wurden die hämodynamischen Parameter PF, PV und die PS im Tumor vor und nach einer einwöchigen Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Regorafenib bzw.



---

Placebo bestimmt. Alle drei quantifizierten Parameter der Tumormikrozirkulation zeigten in der Therapiegruppe eine Abnahme, in der Kontrollgruppe eine Zunahme. Es zeigte sich jedoch nicht in allen Fällen eine signifikante Veränderung. Signifikant waren die Reduktion des PV in der Therapiegruppe und der Anstieg in der Kontrollgruppe, ebenso wie der Anstieg des PS und des PF in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stehen im Wesentlichen in Einklang mit präklinischen und klinischen Studien, die bereits in anderen Tumor- und Therapiemodellen das Potenzial der DCE-CT als bildgebenden Biomarker untersuchten [59, 60]. So konnten Tai et al. in einem Kolonkarzinommodell der Maus bereits nach einer 24-stündigen Therapie mit Vandenib ein signifikantes Absinken von Blutfluss und Blutvolumen in der Therapiegruppe sowie einen signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe zeigen [60]. Es wurde daraus geschlossen, dass die DCE-CT in der Lage ist, die frühen, durch ein antiangiogenetisches Medikament bedingten, mikrovaskulären Veränderungen, zu detektieren. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die DCE-CT als bildgebender Biomarker für das Therapiemonitoring molekularer Therapien genutzt werden kann [56]. In einer anderen, ebenfalls in unserem Institut durchgeführten Studie, konnten an einem mit Sorafenib behandelten Prostatakarzinommodell in der Ratte ähnliche Ergebnisse gezeigt werden, mit signifikanten Korrelationen zur Immunhistochemie. Hier kam es zu einem signifikanten Abfall von PF, PV und PS in der Therapiegruppe und einem signifikanten Anstieg des PF in der Kontrollgruppe [59]. In unserer Studie waren die Veränderungen von PF und PS, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cyran et al. unter Therapie nicht signifikant. Bei dem PF liegt die nicht-signifikante Veränderung in unserer Studie insbesondere an einem Tier, bei dem es zu einem Anstieg des gemessenen Plasmaflusses kam. Bei diesem Tier

handelt es sich jedoch nicht um einen Non-Responder. Wenn man die Immunhistochemie dieses Tieres betrachtet, zeigt es niedrigere Werte für CD-31-, HE- und Ki-67- markierte Zellen als die Tiere der Kontrolle und höhere Werte für TUNEL-markierte Zellen. Eine mögliche Erklärung, warum es bei diesem Tier dennoch zu einer Steigerung des gemessenen PF kam, stellt die Auswahl der ROI in der Arterie für die arterielle Input-Funktion des pharmakokinetischen Modells dar, die signifikanten Einfluss auf die quantitativen Berechnung der Parameter hat [61].

In einer klinischen Studie untersuchten Lind et al. den Wert der DCE-CT zum Therapiemonitoring von 23 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die über sechs Wochen mit einer Kombination aus Sorafenib und Erlotinib behandelt wurden [62]. Der Blutfluss im Tumor, der mit der DCE-CT quantifiziert wurde, wurde mit den RECIST-Kriterien und mit dem progressionsfreien Überleben korreliert. Es zeigte sich dabei eine signifikante Reduktion des Blutflusses im Tumor unter Therapie, der signifikant mit den RECIST-Kriterien korrelierte. Patienten, deren Blutfluss im Tumor stärker als der Median absank, zeigten zudem ein längeres progressionsfreies Überleben. In unserer Studie konnte keine signifikante Korrelation zur Tumorgroße festgestellt werden, dies ist am ehesten auf die deutlich kürzere Therapiezeit zurückzuführen, in der noch keine wesentlichen morphologischen Veränderungen nachweisbar sind. Die Studie von Lind et al. konnte zeigen, dass die DCE-CT auch im klinischen Alltag eingesetzt werden kann und das Potenzial hat, *in vivo* im Patienten frühe antiangiogenetische Effekte nachzuweisen.

In einer von Knobloch et al. veröffentlichten Studie wurden mit drei funktionellen Biomarkern des Therapieansprechens die Effekte von Regorafenib auf Gliom-Xenografts untersucht [32]. Sie verglichen dabei die DCE-CT mit der DE-CT sowie der kontrastverstärkten Computertomographie, wie sie von Choi et al. zum Therapiemonitoring von mit Imatinib behandelten, gastrointestinalen Stromatumoren vorgeschlagen wurde [63]. Mit der DCE-CT zeigten Knobloch et al. einen signifikanten Abfall der Gefäßpermeabilität in der Therapiegruppe, ohne signifikante Veränderungen in der Kontrollgruppe. Blutfluss und Blutvolumen – im Gegensatz zu unserer Studie - zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Therapiegruppe. Mögliche Erklärungen für die abweichenden Ergebnisse im Vergleich zu unserer Studie könnten in den Unterschieden der Therapiedauer, des Tumormodells und des verwendeten kinetischen Modells liegen. Knobloch et al. behandelten die Ratten über vier Tage mit Regorafenib und es handelte sich um ein Gliom-Modell, wobei die Zellen intramuskulär implantiert wurden. Zudem wurde als ROI der ganze Tumor mit möglichen Nekroseanteilen verwendet, in unserer Studie hingegen nur der äußere, vitale Tumoranteil. In der Studie von Knobloch et al. wurde keine immunhistochemische Validierung durchgeführt, die die mikrovaskulären Veränderungen bestätigten.

#### **4.2 DE-CT als Biomarker für ein Therapieansprechen**

Da es sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe zu einer nicht signifikanten Reduktion der jodbedingten Schwächung kam und es keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-up gab, konnte der Effekt der

Regorafenib-Therapie bei uns weder qualitativ noch quantitativ mit DE-CT erfasst werden. Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zu den Messungen der DCE-CT und den immunhistochemischen Ergebnissen.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu verschiedenen Studien, die das Potenzial von DE-CT-Biomarkern für das Therapiemonitoring molekularer Therapien beschreiben. Dai et al. untersuchten in ihrer klinischen, retrospektiven Studie das Therapieansprechen von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen, die mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib behandelt wurden [64]. Sie verglichen dabei die volumetrische Jodaufnahme (VIU) mit der Veränderung der Dichte gemäß den Choi-Kriterien [19] und mit dem Durchmesser des vitalen, kontrastmittelanreichernden Tumors nach den AASLD-Kriterien [65]. VIU beschreibt dabei die Jodaufnahme in Milligramm in dem gesamten Tumolvolumen. Sie konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Jodaufnahme und den AASLD-Kriterien feststellen und folgerten daraus, dass DE-CT-Biomarker das Potenzial zum Therapiemonitoring molekularer, antiangiogenetischer Therapien besitzen. Da in dieser Studie kein Vergleich mit einer Kontrollgruppe durchgeführt wurde und die Ergebnisse nicht immunhistochemisch validiert wurden, stellt sich die Frage, inwieweit die mit den oben angeführten Methoden erhobenen Ergebnisse die tatsächliche Pathophysiologie und insbesondere die mikrovaskulären Veränderungen im Tumor widerspiegeln. Die AASLD-Kriterien, welche heute unter dem Namen mRECIST-Kriterien [66] für Sorafenib-behandelte Patienten mit HCC etabliert sind, wurden bisher nicht immunhistochemisch validiert. Sie zeigten jedoch eine deutlich bessere Korrelation mit dem Überleben der Patienten als die klassischen RECIST-Kriterien [67]. Für

---

die volumetrische Jodaufnahme, wie sie von Dai et al. durchgeführt wurde, wurden bisher noch keine Studien zur Korrelation mit dem Überleben der Patienten durchgeführt.

Meyer et al. konnten in ihrer Studie eine bessere prognostische Aussagekraft der DE-CT gegenüber den RECIST- und Choi-Kriterien bei Patienten mit GIST unter Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren feststellen [68]. Sie ermittelten dabei, ähnlich zu dieser Studie, die jodbedingte Abschwächung (IRA = iodine related attenuation) in einer Schicht des Tumors. Sie entwickelten neue DE-CT-Kriterien, die analog zu RECIST-Kriterien eine Einteilung in die 4 Kategorien complete response, partial response, stable disease und progressive disease treffen. Diese Kriterien konnten, im Gegensatz zu den RECIST- und Choi-Kriterien nach sechs Monaten einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten, die auf die Therapie ansprechen, und Patienten, die nicht ansprechen, feststellen. Auch Knobloch et al. beschrieben in einer tierexperimentellen Studie mit heterotopen Gliom-Xenografts unter Regorafenib-Therapie mit DCE-CT, DE-CT und Choi-Kriterien erhobene Parameter als potenzielle funktionelle Biomarker des Therapieansprechens [32]. Bezüglich der DE-CT stellten sie dabei fest, dass die quantifizierte Jodmenge in der Therapiegruppe nach einem und nach vier Tagen Therapie signifikant gesunken war, wohingegen es zu keiner signifikanten Veränderung in der Kontrollgruppe kam. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied an Tag 4. Zudem konnten sie eine Korrelation zu den, mit der DCE-CT bestimmten, Parametern Permeabilität und Blutvolumen feststellen, jedoch nicht mit dem Blutfluss. In unserer Studie kam es insgesamt zu einem Absinken des gemessenen Jodgehalts zwischen Baseline- und Follow-up-Messung, jedoch

sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe, obwohl in der Immunhistochemie signifikante antiangiogenetische Effekte unter Regorafenib-Therapie nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz zu unserer Studie handelte es sich bei den Studien von Dai et. al und Meyer et al. jeweils um klinische Studien am Patienten. Bei unserer tierexperimentellen Studie kam es bedingt durch das Kleintiermodell und der konsekutiv sehr geringen Tumorgröße zu einem starken Rauschen der Messwerte der jodbedingten Schwächung. Dieses Rauschen stellt eine mögliche Fehlerquelle der Messergebnisse dar, welche im Patienten geringer ausfällt. Weitere Gründe für die Messergebnisse der DE-CT können in der kurzen Therapiedauer und der Auswahl der ROI liegen. Knobloch et al. konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen signifikant niedrigere Jodmengen in der Therapiegruppe messen. Sie verwendeten jedoch ein anderes CT-Protokoll mit einer längeren Messzeit von insgesamt 4 Minuten. Nach 30 Sekunden wurden die Bilder alle 5 Sekunden akquiriert. Eine Validierung durch einen immunhistochemischen Referenzstandard wurde nicht durchgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die DCE-CT das Potenzial hat, funktionelle Parameter der Tumormikrozirkulation zu quantifizieren, die als Biomarker für das *in vivo* Monitoring einer Regorafenib-Therapie dienen können. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die DCE-CT (und bedingt auch die DE-CT) ein nicht-invasives Therapieansprechen und -monitoring antiangiogenetischer Therapien ermöglichen können, jedoch prospektive, multizentrische Studien zur Validierung und Translation der erhobenen Parameter in ein klinisches Setting

notwendig sind. Außerdem sind Korrelationen der erhobenen Parameter zum progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben von Bedeutung. Gerade die Unterschiede in den Ergebnissen zeigen außerdem die Notwendigkeit weiterer Studien mit DCE- und DE-CT, um so allgemeine Standards zu finden, die Vergleiche auch zwischen verschiedenen Studienzentren ermöglichen.

### **4.3 Tumordurchmesser**

In dieser Studie zeigte sich in der Therapiegruppe keine signifikante Änderung des Tumordurchmessers zwischen Baseline- und Follow-up-Messung. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Durchmessers. Es ließ sich jedoch keine signifikante Korrelation zur Immunhistochemie feststellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass der Tumordurchmesser kein geeigneter Biomarker für die Beurteilung früher Effekte antiangiogenetischer Therapien darstellt. Choi et al. zeigten bereits 2004, dass die Tumorgöße allein, ein unzuverlässiger Parameter für das Monitoring einer frühen Imatinib-Therapie in GIST darstellt und entwickelte die Choi-Kriterien für gastrointestinale Stromatumore, wonach sowohl die Tumorgöße, als auch die Dichte in der kontrastverstärkten CT berücksichtigt werden [19, 69].

### **4.4 Immunhistochemische Validierung der CT-Biomarker**

Um die Wirkung von Regorafenib auf die heterotopen, subkutanen Kolonkarzinom-Xenografts zu überprüfen, wurden die Tumore immunhistochemisch aufgearbeitet und

ausgewertet. Mit der CD31-Färbung konnte nach einer siebentägigen Therapie ein antiangiogenetischer Effekt mit signifikant niedrigerer mikrovaskulärer Gefäßdichte durch Regorafenib nachgewiesen werden. Ebenso zeigten sich proapoptotische und pronekrotische Effekte, welche mit der TUNEL- und der HE-Färbung nachgewiesen wurden. Bei fehlender Signifikanz in der Ki-67-Färbung konnte in dieser Studie kein signifikanter antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit veröffentlichten Studien über die Wirkung von Regorafenib. In einer ersten Studie zu Regorafenib von Wilhelm et al. zeigte der Multikinase-Inhibitor in einem Mausmodell mit einem subkutanen COLO-205 Kolonkarzinom-Xenograft ebenfalls signifikante antiangiogenetische Effekte in der CD31-Färbung [8]. In einer Studie von Abou-Elkacem et al. wurden Mäuse mit orthotopem Kolonkarzinommodell der Zellreihe CT26 täglich mit 30 mg/kg Körpergewicht Regorafenib behandelt und jeweils nach 7, 11 und 14 Tagen immunhistochemisch ausgewertet. Auch hier zeigte sich ein antiangiogenetischer Effekt in der CD31-Färbung, welcher jedoch erst ab dem 11. Tag der Therapie signifikant war [70]. Im Unterschied zu der in dieser Studie verwendeten HT-29-Zellreihe handelt es sich bei der Zellreihe CT26 um ein hochaggressives Karzinom der Maus, welches sich in Wachstum und Therapieansprechen von der humanen HT-29-Zellreihe unterscheidet. Möglicherweise ist aus diesem Grund der antiangiogenetische Effekt bei dem gut differenzierten, humanen Kolonkarzinommodell HT-29 bereits nach einer siebentägigen Therapie nachweisbar. In einer anderen, an unserem Institut durchgeführten Studie wurde im identischen Kolonkarzinom-Modell ebenfalls ein signifikanter antiangiogenetischer, proapoptotischer und pronekrotischer Effekt von Regorafenib nach einwöchiger Therapie nachgewiesen. Im



Gegensatz zu den Ergebnissen in der vorliegenden Studie, wurde auch ein antiproliferativer Effekt von Regorafenib in der Ki-67-Färbung gezeigt [22]. Die mit der DCE-CT bestimmten Parameter korrelierten signifikant und sehr gut mit den histologischen Markern für Gefäßdichte, Apoptose und Nekrose. Zu dem Proliferationsmarker Ki-67 konnte keine Korrelation festgestellt werden.

#### **4.5 Limitationen**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben verschiedene Limitationen. Es handelte sich um ein heterotopes Xenograft-Modell in der immundefizienten, athymischen Ratte. Aufgrund der bestehenden Unterschiede in Anatomie und Physiologie zwischen Tier und Mensch und einer unphysiologischen Immunlage, können die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Zudem schränkt die heterotope Lage des Tumors an der Flanke die Vergleichbarkeit mit klinischen Studien auf Grund einer möglicherweise veränderten Tumorpathophysiologie ein. Außerdem wurde in der vorliegenden Studie eine sehr kurze Therapiedauer von nur sieben Tagen gewählt, um die frühzeitigen Effekte der Therapie zu erfassen. In der Klinik werden Verlaufsuntersuchungen oft erst nach mehreren Monaten durchgeführt [7]. Die langfristige Wirkung sowie mögliche späte Nebenwirkungen von Regorafenib werden in dieser Studie somit nicht erfasst, auch nicht das Gesamtüberleben. Bei der Auswahl der ROI besteht eine Untersucherabhängigkeit, da diese manuell eingezeichnet wurden. Zur Minimierung der Untersucherabhängigkeit wurden die ROIs in der vorliegenden Studie unter Zuhilfenahme von semiquantitativen Parametern

ausgewählt. Dennoch können in der ausgewählten Region nekrotische Anteile nicht sicher ausgeschlossen werden, was zu falsch niedrigen Ergebnissen der Perfusionsparameter führen kann. Auch bei den immunhistochemischen Auswertungen können aufgrund der Erfahrung des Untersuchers Unterschiede auftreten. In unserer Studie wurde die Immunhistochemie jedoch immer vom gleichen Untersucher mit >10 Jahren Erfahrung geblindet ausgewertet. Zudem wird bei der Analyse nur ein kleiner Teil des gesamten Tumors untersucht, es wurde jedoch darauf geachtet, dass dieser möglichst repräsentativ ist. Es wurde nur ein einzelnes Tumor- und Therapiemodell untersucht, weshalb die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf andere Tumore und Therapiekonzepte übertragbar sind.

## 5 Zusammenfassung

In dieser tierexperimentellen Studie wurden die beiden funktionellen computertomographischen Methoden DCE-CT und DE-CT im Hinblick auf ihr Potenzial untersucht die Effekte einer Regorafenib-Therapie auf Kolonkarzinome frühzeitig quantitativ zu erfassen. Hierzu wurden  $n = 15$  Ratten subkutan humane Kolonkarzinomzellen (HT-29) implantiert und es erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Tiere zur Therapie- oder Kontrollgruppe. Nach etwa zweiwöchiger Wachstumsphase wurden die DCE- und DE-CT-Baseline-Messungen durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere für sechs Tage behandelt, wobei die Therapietiere eine einwöchige, gewichtsadaptierte Therapie mit Regorafenib und die Kontrolltiere eine volumenäquivalente Menge Placebo erhielten. An Tag 7 erfolgte eine Follow-up-Messung mit DCE-CT und DE-CT. Bei der DCE-CT wurden die funktionellen Parameter der Tumormikrozirkulation Plasmafluss, Plasmavolumen und Gefäßpermeabilität bestimmt. Bei der DE-CT wurde die jodbedingte Schwächung (in HU) im Tumor als Korrelat der Tumorperfusion berechnet. Nach dem Follow-up wurden die Tiere euthanasiert, die Tumoren explantiert und zur Validierung der Ergebnisse immunhistochemisch mit Markern für die mikrovaskuläre Gefäßdichte (CD 31), Apoptose (TUNEL), Proliferation (Ki-67) und Nekrose (HE) aufbereitet.

Nach einer einwöchigen Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Regorafenib zeigte sich in der DCE-CT eine signifikante Abnahme von PV. Unter Placebo kam es zu einem signifikanten Anstieg von PF und PS, während sich in der Therapiegruppe keine signifikanten Änderungen

ergaben. Es ließen sich gute Korrelationen zu den immunhistochemischen Färbungen feststellen: die Ergebnisse der DCE-CT korrelierten dabei signifikant mit der Gefäßdichte (CD 31) und invers mit der Apoptose (TUNEL). Bei der DE-CT konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe festgestellt werden und auch keine signifikanten Korrelationen zur Immunhistochemie.

Die Ergebnisse der aktuellen Studien untermauern die Hypothese, dass die DCE-CT für das frühzeitige Therapiemonitoring antiangiogenetischer Therapien in soliden Tumoren geeignet ist. Die erhobenen funktionellen Parameter sollten jedoch im Hinblick auf die biologische Relevanz weiter untersucht werden. Weitere, klinische Studien sind notwendig, die die Translation in den Menschen und auch die Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben untersuchen. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Studienzentren ist eine Standardisierung der Akquisitions- und Analyseprotokolle notwendig.

Die DE-CT kann in Anbetracht der Ergebnisse der aktuellen Studie bei nicht signifikanten Unterschieden zwischen Therapie- und Kontrollgruppe sowie fehlender Korrelation zur Immunhistochemie nicht ohne weiteres als funktioneller Biomarker für das Therapieansprechen empfohlen werden, wenngleich andere Studien positive Ergebnisse erbrachten. Es sollten sich in jedem Fall weitere Studien anschließen, um diese vielversprechende Methodik weiter zu untersuchen und zu optimieren.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Motzer, R.J., L. McCann, and K. Deen, *Pazopanib versus sunitinib in renal cancer*. N Engl J Med, 2013. **369**(20): p. 1970.
2. Sherman, S.I., *Targeted therapies for thyroid tumors*. Mod Pathol, 2011. **24 Suppl 2**: p. S44-52.
3. Ziogas, I.A. and G. Tsoulfas, *Evolving role of Sorafenib in the management of hepatocellular carcinoma*. World J Clin Oncol, 2017. **8**(3): p. 203-213.
4. Figueiras, R.G., et al., *Novel oncologic drugs: what they do and how they affect images*. Radiographics, 2011. **31**(7): p. 2059-91.
5. Gupta, M.K. and R.Y. Qin, *Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(6): p. 1144-55.
6. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
7. Grothey, A., et al., *Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2013. **381**(9863): p. 303-12.
8. Wilhelm, S.M., et al., *Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity*. Int J Cancer, 2011. **129**(1): p. 245-55.
9. *FDA approves regorafenib (Stivarga) for metastatic colorectal cancer*. Oncology (Williston Park), 2012. **26**(10): p. 896.
10. *FDA approves regorafenib (Stivarga) for GIST*. Oncology (Williston Park), 2013. **27**(3): p. 164.
11. Calcagno, F., et al., *Efficacy, Safety and Cost of Regorafenib in Patients with Metastatic Colorectal Cancer in French Clinical Practice*. Clin Med Insights Oncol, 2016. **10**: p. 59-66.
12. Goldstein, D.A., et al., *Cost-Effectiveness Analysis of Regorafenib for Metastatic Colorectal Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(32): p. 3727-32.
13. WHO, *WHO offset publication No. 48, WHO handbook for reporting results of cancer*. Geneva, Switzerland, 1979.
14. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(3): p. 205-16.
15. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. Eur J Cancer, 2009. **45**(2): p. 228-47.
16. Diederich, S., *Imaging beyond RECIST: CT and MRI in molecular therapies*. Cancer Imaging, 2012. **12**: p. 347-50.

17. Rezai, P., et al., *A radiologist's guide to treatment response criteria in oncologic imaging: functional, molecular, and disease-specific imaging biomarkers*. AJR Am J Roentgenol, 2013. **201**(2): p. 246-56.
18. Young, H., et al., *Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations*. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. Eur J Cancer, 1999. **35**(13): p. 1773-82.
19. Choi, H., et al., *CT evaluation of the response of gastrointestinal stromal tumors after imatinib mesylate treatment: a quantitative analysis correlated with FDG PET findings*. AJR Am J Roentgenol, 2004. **183**(6): p. 1619-28.
20. Goshen, E., et al., *PET/CT in the evaluation of response to treatment of liver metastases from colorectal cancer with bevacizumab and irinotecan*. Technol Cancer Res Treat, 2006. **5**(1): p. 37-43.
21. Sterzik, A., et al., *DCE-MRI biomarkers for monitoring an anti-angiogenic triple combination therapy in experimental hypopharynx carcinoma xenografts with immunohistochemical validation*. Acta Radiol, 2015. **56**(3): p. 294-303.
22. Eschbach, R.S., et al., *Correlation of Perfusion MRI and 18F-FDG PET Imaging Biomarkers for Monitoring Regorafenib Therapy in Experimental Colon Carcinomas with Immunohistochemical Validation*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0115543.
23. d'Assignies, G., et al., *Pancreatic endocrine tumors: tumor blood flow assessed with perfusion CT reflects angiogenesis and correlates with prognostic factors*. Radiology, 2009. **250**(2): p. 407-16.
24. Chen, Y., et al., *Angiogenesis of renal cell carcinoma: perfusion CT findings*. Abdom Imaging, 2010. **35**(5): p. 622-8.
25. Goh, V., et al., *Colorectal tumor vascularity: quantitative assessment with multidetector CT--do tumor perfusion measurements reflect angiogenesis?* Radiology, 2008. **249**(2): p. 510-7.
26. Johnson, T.R., *Dual-energy CT: general principles*. AJR Am J Roentgenol, 2012. **199**(5 Suppl): p. S3-8.
27. Graser, A., et al., *Dual energy CT characterization of urinary calculi: initial in vitro and clinical experience*. Invest Radiol, 2008. **43**(2): p. 112-9.
28. Mileto, A., et al., *Dual-Energy MDCT for Imaging the Renal Mass*. AJR Am J Roentgenol, 2015: p. W1-W8.
29. Schwarz, F., et al., *Quantification of coronary artery calcium on the basis of dual-energy coronary CT angiography*. Radiology, 2012. **264**(3): p. 700-7.
30. Simons, D., M. Kachelriess, and H.P. Schlemmer, *Recent developments of dual-energy CT in oncology*. Eur Radiol, 2014. **24**(4): p. 930-9.
31. Apfaltrer, P., et al., *Contrast-enhanced dual-energy CT of gastrointestinal stromal tumors: is iodine-related attenuation a potential indicator of tumor response?* Invest Radiol, 2012. **47**(1): p. 65-70.

- 
32. Knobloch, G., et al., *Dual-energy computed tomography for the assessment of early treatment effects of regorafenib in a preclinical tumor model: comparison with dynamic contrast-enhanced CT and conventional contrast-enhanced single-energy CT*. Eur Radiol, 2014. **24**(8): p. 1896-905.
  33. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 221-6.
  34. Crona, D.J., M.D. Keisler, and C.M. Walko, *Regorafenib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor for colorectal cancer and gastrointestinal stromal tumors*. Ann Pharmacother, 2013. **47**(12): p. 1685-96.
  35. Fachinformation, *Ultravist® -150, -240, -300, -370*. 2014.
  36. Biffar, A., et al., *Measurement of perfusion and permeability from dynamic contrast-enhanced MRI in normal and pathological vertebral bone marrow*. Magn Reson Med, 2010. **64**(1): p. 115-24.
  37. Koh, T.S., et al., *Fundamentals of tracer kinetics for dynamic contrast-enhanced MRI*. J Magn Reson Imaging, 2011. **34**(6): p. 1262-76.
  38. Sourbron, S., *Technical aspects of MR perfusion*. Eur J Radiol, 2010. **76**(3): p. 304-13.
  39. Ingrisch, M. and S. Sourbron, *Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT: a primer*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2013. **40**(3): p. 281-300.
  40. Miles, K.A., M.R. Griffiths, and M.A. Fuentes, *Standardized perfusion value: universal CT contrast enhancement scale that correlates with FDG PET in lung nodules*. Radiology, 2001. **220**(2): p. 548-53.
  41. Schwab, F., et al., *Tracer kinetic modeling in myocardial perfusion quantification using MRI*. Magn Reson Med, 2015. **73**(3): p. 1206-15.
  42. Preda, A., et al., *The choice of region of interest measures in contrast-enhanced magnetic resonance image characterization of experimental breast tumors*. Invest Radiol, 2005. **40**(6): p. 349-54.
  43. Brix, G., et al., *Tracer kinetic modelling of tumour angiogenesis based on dynamic contrast-enhanced CT and MRI measurements*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010. **37 Suppl 1**: p. S30-51.
  44. Avrin, D.E., A. Macovski, and L.E. Zatz, *Clinical application of Compton and photo-electric reconstruction in computed tomography: preliminary results*. Invest Radiol, 1978. **13**(3): p. 217-22.
  45. Havla, L., et al., *Material characterization of dual-energy computed tomographic data using polar coordinates*. J Comput Assist Tomogr, 2015. **39**(1): p. 134-9.
  46. Flohr, T.G., et al., *First performance evaluation of a dual-source CT (DSCT) system*. Eur Radiol, 2006. **16**(2): p. 256-68.
  47. Johnson, T.R., et al., *Dual-source CT cardiac imaging: initial experience*. Eur Radiol, 2006. **16**(7): p. 1409-15.

- 
48. Dai, C., et al., *Differentiation of renal cell carcinoma subtypes with different iodine quantification methods using single-phase contrast-enhanced dual-energy CT: areal vs. volumetric analyses*. Abdom Radiol (NY), 2017.
  49. Zhou, B., et al., *Detection and quantification of coronary calcium from dual energy chest x-rays: Phantom feasibility study*. Med Phys, 2017.
  50. Graser, A., et al., *Dual energy CT: preliminary observations and potential clinical applications in the abdomen*. Eur Radiol, 2009. **19**(1): p. 13-23.
  51. White, D.R., *An analysis of the Z-dependence of photon and electron interactions*. Phys Med Biol, 1977. **22**(2): p. 219-28.
  52. Henson, P.W., *A relationship between CT number, effective atomic number and electron density*. Australas Phys Eng Sci Med, 1984. **7**(2): p. 69-73.
  53. Krieger, H., *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 4 ed. 2012: Wiesbaden: Springer Spektrum, Vieweg + Teubner Verlag.
  54. Johnson, T.R., et al., *Material differentiation by dual energy CT: initial experience*. Eur Radiol, 2007. **17**(6): p. 1510-7.
  55. Kim, Y.N., et al., *Dual-energy CT in patients treated with anti-angiogenic agents for non-small cell lung cancer: new method of monitoring tumor response?* Korean J Radiol, 2012. **13**(6): p. 702-10.
  56. Cyran, C.C., et al., *Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76009.
  57. Paprottka, P.M., et al., *Reducing tumor growth and angiogenesis using a triple therapy measured with Contrast-enhanced ultrasound (CEUS)*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 373.
  58. Strahlenschutz, B.f., *Röntgendiagnostik - Nutzen und Risiko [Online im Internet:] URL: [http://www.bfs.de/SharedDocs/Downloads/BfS/DE/broschueren/ion/stko-roentgen.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.bfs.de/SharedDocs/Downloads/BfS/DE/broschueren/ion/stko-roentgen.pdf?__blob=publicationFile&v=2) [Stand:26.04.2017, 11:18]* 2016.
  59. Cyran, C.C., et al., *Dynamic contrast-enhanced computed tomography imaging biomarkers correlated with immunohistochemistry for monitoring the effects of sorafenib on experimental prostate carcinomas*. Invest Radiol, 2012. **47**(1): p. 49-57.
  60. Tai, J.H., et al., *Assessment of acute antivascular effects of vandetanib with high-resolution dynamic contrast-enhanced computed tomographic imaging in a human colon tumor xenograft model in the nude rat*. Neoplasia, 2010. **12**(9): p. 697-707.
  61. Garcia-Figueiras, R., et al., *CT perfusion in oncologic imaging: a useful tool?* AJR Am J Roentgenol, 2013. **200**(1): p. 8-19.
  62. Lind, J.S., et al., *Dynamic contrast-enhanced CT in patients treated with sorafenib and erlotinib for non-small cell lung cancer: a new method of monitoring treatment?* Eur Radiol, 2010. **20**(12): p. 2890-8.
  63. Choi, H., et al., *Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a*



- single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria.* J Clin Oncol, 2007. **25**(13): p. 1753-9.
64. Dai, X., et al., *Quantitative therapy response assessment by volumetric iodine-uptake measurement: initial experience in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib.* Eur J Radiol, 2013. **82**(2): p. 327-34.
65. Bruix, J., M. Sherman, and D. American Association for the Study of Liver, *Management of hepatocellular carcinoma: an update.* Hepatology, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
66. Lencioni, R. and J.M. Llovet, *Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma.* Semin Liver Dis, 2010. **30**(1): p. 52-60.
67. Edeline, J., et al., *Comparison of tumor response by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) and modified RECIST in patients treated with sorafenib for hepatocellular carcinoma.* Cancer, 2012. **118**(1): p. 147-56.
68. Meyer, M., et al., *CT-based response assessment of advanced gastrointestinal stromal tumor: Dual energy CT provides a more predictive imaging biomarker of clinical benefit than RECIST or Choi criteria.* Eur J Radiol, 2013.
69. D'Anastasi, M., et al., *[Criteria for radiological assessment of therapy response: criteria-based appraisal].* Radiologe, 2013. **53**(4): p. 322-8.
70. Abou-Elkacem, L., et al., *Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model.* Mol Cancer Ther, 2013. **12**(7): p. 1322-31.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$^{18}\text{F}$ -FDG	$^{18}\text{F}$ -Fluordesoxy-Glukose
AUC	Area under the curve
CD31	Cluster of Differentiation 31
CR	Complete Response
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCE-CT	Dynamische kontrastverstärkte Computertomographie
DE-CT	Dual-Energy Computertomographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FOLFIRI	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HE	Hämatoxylin-Eosin

HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HU	Hounsfield Unit
Ki-67	Kiel 67
MVD	Microvascular Density,
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Progressive Disease
PDGFR	Platelet-derived growth factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PF	Plasmafluss
PMI	Platform for Research in Medical Imaging
PR	Partial Response
PS	Permeability-Surface Area Product
PV	Plasmavolumen
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
ROI	Region of Interest
SD	Stable Disease
SD	Standardabweichung
SPF	spezifisch Pathogen-frei

TUNEL	Terminal Desoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VNC	virtual non-enhanced
WHO	World Health Organization

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Individuelle Werte aller Tiere von PF, PV und PS an Tag 0 und Tag 7 in der Therapie- und Kontrollgruppe.....	41
<b>Tabelle 2:</b> Individuelle Messergebnisse des Tumordurchmessers an Tag 0 und Tag 7 mit prozentualer Veränderung in der Therapie- und Kontrollgruppe. ....	45
<b>Tabelle 3:</b> Individuelle Werte der immunhistochemischen Färbungen mit HE, Ki-67, TUNEL und CD31 in der Therapie- und Kontrollgruppe.....	47
<b>Tabelle 4:</b> Spearman-Rangkorrelationkoeffizient $\rho$ für die Korrelationen der Ergebnisse der DCE-CT-Messung mit der Immunhistochemie (** = $p < 0,01$ , * = $p < 0,05$ ). ....	53
<b>Tabelle 5:</b> Spearman-Rangkorrelationkoeffizient $\rho$ für die Korrelationen der Ergebnisse der DE-CT-Messung mit der Immunhistochemie. Es konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. ....	56
<b>Tabelle 6:</b> Spearman-Rangkorrelationkoeffizient $\rho$ der Korrelationen der Perfusionsparameter der DCE-CT-Messung mit der jodbedingten Schwächung in der DE-Messung. Es konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. ....	57
<b>Tabelle 7:</b> Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $\rho$ für die Korrelation von Tumordurchmesser mit den Ergebnissen der CT-Perfusion. Es konnten dabei keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). ....	57
<b>Tabelle 8:</b> Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $\rho$ für die Korrelation von Tumordurchmesser mit den Ergebnissen der Immunhistochemie. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation ( $p > 0,05$ ).....	57

---

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Versuchsaufbau mit Einteilung in Therapie- und Kontrollgruppe .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Zeitachse des chronologischen Versuchsablaufs .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Strukturformel von Regorafenib ( $C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$ ),.....	12
<b>Abbildung 4:</b> Regorafenib blockiert zahlreiche membranständige Rezeptoren (u.a. VEGFR-1,2 und 3, TIE-2 und PDGFR) und intrazelluläre Kinasen (Raf). Hierdurch werden Signalwege der Angiogenese und Proliferation des Tumors gehemmt. ....	13
<b>Abbildung 5:</b> Strukturformel des Kontrastmittels Iopromid, $C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$ , .....	17
<b>Abbildung 6:</b> Repräsentative Kurven der Signalintensität (HU) über die Zeit (s) in der Arterie (oben) und im Tumor (unten), jeweils in der Baseline- und Follow-up-Messung in einem exemplarischen Therapietier. Man beachte hier die unterschiedlichen Kurvenverläufe im Tumor zwischen Baseline und Follow-up.....	19
<b>Abbildung 7:</b> Exemplarische axiale CT-Bilder eines Versuchstieres mit dem Tumorexograft über der linken Flanke. Links: Maximum of the curve, Mitte: Area under the curve, Rechts: ausgewählte ROI. Man beachte die ringförmige Form entsprechend des vitalen Tumorgewebes.....	21
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung des Two-compartment-uptake. Das Kontrastmittel verteilt sich mit einem bestimmten Plasmafluss ( $F_p$ ) im intravasalen Volumen $v_p$ und verlässt dieses über die Gefäßwand in den extravasalen Raum ( $v_e$ ), abhängig von dem Ausmaß der Permeabilität PS .....	22

---

<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung einer Gantry eines Dual-Source-Computertomographen mit zwei, um 90° versetzten, Röntgenröhren (Kreis) und gegenüberliegenden Detektoren (Ellipse). Die blaue Röntgenröhre wird mit 80 kV Spannung und die rote mit 140 kV Spannung betrieben.....	26
<b>Abbildung 10:</b> Dreimaterialzerlegung (VNC = virtual non-contrast = virtuell nicht kontrastiert). Man beachte den linearen Zusammenhang der zwei Basismaterialien in Form einer Gerade, welcher sich durch die Zugabe von Jod verändert. ....	27
<b>Abbildung 11:</b> Jodanreicherung im Tumor über die Zeit (HU) mit den Medianen von jeweils fünf gemittelten Messwerten $t_1$ und $t_2$ , exemplarisch in der Baseline-Messung eines Therapietiers. ....	28
<b>Abbildung 12:</b> Plasmafluss in der Therapie- und Kontrollgruppe. Man beachte die nicht-signifikante Abnahme in der Therapiegruppe links ( $p > 0,05$ ) im Gegensatz zum signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe rechts ( $p < 0,05$ ). In der Therapiegruppe kam es bei allen Tieren zu einer Abnahme des PF mit Ausnahme eines einzelnen Tieres, bei dem der PF anstieg. ....	36
<b>Abbildung 13:</b> Boxplot-Diagramm des Plasmaflusses in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm stellt den signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe dar, sowie den signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bei der Follow-up-Messung. ....	37
<b>Abbildung 14:</b> Plasmavolumen in der Therapie- und Kontrollgruppe. Es zeigt sich links ein signifikanter, unidirektionaler Rückgang des Plasmavolumens ( $p < 0,05$ ) in der	

---

Therapiegruppe, rechts hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Kontrollgruppe bei omnidirektionalem Verlauf der Einzelmesswerte..... 38

**Abbildung 15:** Boxplot-Diagramm des Plasmavolumens in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm zeigt die signifikante Reduktion von PV in der Therapiegruppe. Man beachte auch den signifikanten Unterschied an Tag 7 zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bei gleichen Ausgangsbedingungen an Tag 0..... 38

**Abbildung 16:** PS in der Therapie- und Kontrollgruppe. Das linke Diagramm zeigt keine signifikanten Veränderungen in der Therapiegruppe bei omnidirektionalem Verlauf der Einzelmesswerte. Das rechte Diagramm zeigte einen signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe. .... 39

**Abbildung 17:** Boxplot-Diagramm von PS in Therapie- (hellgrau) und Kontrollgruppe (dunkelgrau), jeweils an Tag 0 und 7. Das Diagramm zeigt den signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe sowie den signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe an Tag 7. .... 40

**Abbildung 18:** Boxplot-Diagramm der Jodanreicherung zum Zeitpunkt  $t_1$  für Therapie- und Kontrollgruppe. Es zeigen sich weder zwischen Tag 0 und Tag 7, noch zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede. .... 43

**Abbildung 19:** Veränderungen des Tumordurchmessers im Therapieverlauf in mm, links in der Therapiegruppe, rechts in der Kontrollgruppe. Es zeigt sich die signifikante Zunahme in



---

der Kontrollgruppe, während sich in der Therapiegruppe keine signifikanten Änderungen ergaben. .... 44

**Abbildung 20:** Repräsentative immunhistochemische Färbungen für die mikrovaskuläre Gefäßdichte (CD31, A und B), die Apoptose (TUNEL, C und D) und die Zellproliferation (Ki-67, E und F), links in der Kontrollgruppe, rechts in der Therapiegruppe. Man beachte die signifikant geringere Anzahl der CD31-positiven Zellen in der Therapiegruppe (B) und die signifikant höhere Anzahl an fluoreszierenden, apoptotischen Zellen in der TUNEL-Färbung in der Therapiegruppe (D) aus Cyran et al. [56]..... 48

**Abbildung 21:** Boxplot-Diagramm der HE-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt den signifikant höheren Anteil an nekrotischen Zellen in der Therapiegruppe ( $p < 0,01$ ). .... 49

**Abbildung 22:** Boxplot-Diagramm der CD31-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt den signifikant niedrigen Anteil an Gefäßendothelzellen in der Therapiegruppe, entsprechend einer geringeren mikrovaskulären Gefäßdichte ( $p < 0,01$ )... 50

**Abbildung 23:** Boxplot-Diagramm der Ki-67-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Man sieht keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Ki-67-markierten Zellen zwischen den beiden Gruppen ( $p > 0,05$ ). .... 51

**Abbildung 24:** Boxplot-Diagramm der TUNEL-Färbung für Therapie- und Kontrollgruppe. Man sieht die signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen in der Therapiegruppe ( $p < 0,05$ )..... 52

**Abbildung 25:** Das Streudiagramm zeigt die signifikante Korrelation zwischen dem Plasmafluss und der CD31-Färbung ( $p < 0,01$ )..... 54

**Abbildung 26:** Das Streudiagramm zeigt die signifikante inverse Korrelation zwischen PV und der Zahl apoptotischer Tumorzellen ( $p < 0,01$ )..... 55

## **10 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR, welcher mir die Durchführung dieser Doktorarbeit am Institut für Klinische Radiologie des Klinikums der Universität München ermöglichte.

Ich bedanke mich außerdem bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Clemens Cyran sowie meinem Betreuer Herrn Dr. Ralf Eschbach für ihre stetige Unterstützung, ihre Ratschläge, konstruktive Kritik und Motivation.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Team des Labors für Experimentelle Radiologie meinen Dank aussprechen sowie den Kollegen der radiologischen Physik, welche mir insbesondere bei den physikalischen Grundlagen der CT stets mit fachlicher Kompetenz zur Seite standen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Konstantinos danke ich für die moralische Unterstützung und Aufmunterung während der gesamten Zeit dieser Doktorarbeit ohne die ich manchmal kurz vor dem Aufgeben war.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Alexandra Michels, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Dynamische, kontrastverstärkte Computertomographie und Dual-Energy-  
Computertomographie zum Monitoring der Therapieeffekte von Regorafenib auf  
experimentelle Kolonkarzinom-Xenografts in der Ratte“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 04.11.2018

---

Ort, Datum

---

Alexandra Lialias, geb. Michels